

**Hyperforin-Biosynthese:
cDNA Klonierung der Isobutyrophenon-Synthase
aus *Hypericum perforatum* und *H. calycinum***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

Von William Meva Meva
aus Akonolinga / Kamerun

1. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues
2. Referent: Professor em. Dr. Thomas Hartmann
eingereicht am: 25.11.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.12.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag in Form einer Posterpräsentation

Meva Meva, W., Beerhues, L. (2007)

Hyperforin Biosynthesis: cDNA Cloning of Isobutyrophenone Synthase.
Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft.
(Hamburg, 3.-7. September 2007)

Meva Meva, W., Beerhues, L. (2009)

Hyperforin Biosynthesis: cDNA Cloning of the Skeleton-Forming Polyketide Synthase.
Internationale DPhG-Doktorandentagung.
(Pichlarn in Österreich, 18.-21. November 2009)

Tagungsbeitrag in Form eines Kurzvortrags

Meva Meva, W., Beerhues, L. (2009)

Hyperforin-Biosynthese: cDNA Klonierung der Isobutyrophenon-Synthase aus *Hypericum* sp.
Treffen der Sektion "Pflanzliche Naturstoffe" der Deutschen Botanischen Gesellschaft.
(Fulda, 30. März 2009 - 1. April 2009)

Danksagung

Ich möchte meine Dankbarkeit vielen Personen ausdrücken, die mich im Laufe meiner Doktorarbeit unterstützten.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ludger Beerhues, danke ich ganz besonders für die Überlassung des interessanten Themas, die stets freundliche Unterstützung und sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. em. Dr. Thomas Hartmann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Benye Liu gilt mein Dank für die wertvollen Hinweise zur molekularen Klonierung.

Bei Dr. Hussein Ramadan bedanke ich mich für die hilfreichen Tipps in der ersten Phase dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Beerhues danke ich für viele produktive Stunden im Labor und wertvolle Unterstützungen.

Besonderer Dank gilt Frau Ines Rahaus für die unermüdliche Sequenzierung und nützlichen Ratschläge.

Vielen Dank allen Personen und Mitgliedern des Instituts für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig.

Für die Finanzierung dieses Forschungsprojekts möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Freundin für die Unterstützung, die Motivation und die Vorschläge bedanken.

Für Eure Geduld, Eure Hilfe und Euer Verständnis: Herzlichen Dank.

Inhaltsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	I
Tabellen	V
Abbildungen	VII
Abkürzungen	X
1. Einleitung	1
1.1 Sekundäre Pflanzenstoffe	1
1.2 Johanniskraut-Extrakt als Antidepressivum	3
1.3 <i>Hypericum perforatum</i>	5
1.3.1 Geschichte	5
1.3.2 Botanik	6
1.3.3 Inhaltsstoffe und Wirkungen	7
1.3.3.1 Hypericine	8
1.3.3.2 Xanthone	8
1.3.3.3 Flavonoide	9
1.3.3.4 Hyperforine	10
1.4 <i>Hypericum calycinum</i>	12
1.5 Biosynthese der Hyperforine	13
1.6 Polyketide und Polyketid-Synthasen	14
1.6.1 Polyketide	14
1.6.2 Polyketid-Synthasen	15
1.6.2.1 Polyketid-Synthasen I	16
1.6.2.2 Polyketid-Synthasen II	16
1.6.2.3 Polyketid-Synthasen III	16
1.6.3 Beispiele für Typ III-Polyketid-Synthasen	17
1.6.3.1 Chalkon-Synthase (CHS) und Stilben-Synthase (STS)	17
1.6.3.2 Benzophenon-Synthase (BPS) und Biphenyl-Synthase (BIS)	18
1.6.3.3 Valerophenon-Synthase (VPS)	19
1.6.3.4 Isobutyrophenon-Synthase (BUS)	19
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
2. Material	21
2.1 Pflanzenmaterial	21
2.1.1 Intakte Pflanzen	21
2.1.2 Pflanzengewebekulturen	21
2.1.2.1 Anlegen einer Zellsuspensionskultur	22
2.1.2.2 Kultivierung von Kallus- und Zellsuspensionskulturen	22
2.2 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer	23
2.2.1 Chemikalien, biochemische und molekularbiologische Reagenzien	23
2.2.2 Nährmedien für Pflanzengewebekulturen	24
2.2.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie	26
2.2.3.1 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	26
2.2.3.2 Lösungen für die Transformation und Selektion von <i>E. coli</i>	26
2.2.3.3 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese	27

2.2.3.4 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	27
2.3 Enzyme	28
2.4 Kits	29
2.5 Bakterienstämme und Vektoren	29
2.5.1 Bakterienstämme	29
2.5.2 Vektoren	30
2.6 Nukleotide	30
2.7 Oligonukleotide	30
2.7.1 SMART-RACE Primer	30
2.7.2 Vektor-Primer	31
2.7.3 Degenerierte Primer für 5' und 3' TAIL-PCR	31
2.7.4 Degenerierte Primer für PKS	31
2.7.5 Gen-spezifische Primer der mutmaßlichen Isobutyrophenon-Synthase cDNAs	31
2.8 Geräte	33
2.9 Computerprogramme	34
3. Gentechnische Methoden	35
3.1 Pflanzenmaterial	35
3.1.1 Intakte Pflanzen	35
3.1.2 Zellkulturen von <i>Hypericum calycinum</i>	35
3.2. Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i>	35
3.2.1 Lagerung von Bakterienkulturen	36
3.2.2 Messung der optischen Dichte (OD)	36
3.2.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	36
3.3 Oligonukleotide	36
3.3.1 Einbau von Restriktionsschnittstellen in Expressionsprimer	37
3.4 Isolierung von RNA	37
3.4.1 Isolierung von poly(A ⁺)-RNA	37
3.4.2 Isolierung von gesamt-RNA	38
3.5 Isolierung von genomischer DNA	38
3.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren	38
3.7 Fällung von DNA	39
3.8 cDNA Synthese	39
3.8.1 5'- und 3'-RACE mittels SMART-Verfahren	39
3.8.1.1 cDNA-Synthese mittels M-MuLV Reverse Transcriptase	40
3.8.1.2 cDNA-Synthese mittels PrimeScript TM Reverse Transcriptase	41
3.8.2 Synthese von 5'-cDNA mittels Terminaler Transferase	42
3.9 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR)	42
3.9.1 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	46
3.9.2 Touch-down-PCR	46
3.9.3 Nested-PCR	46
3.9.4 RT-PCR	47
3.9.5 Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR)	47
3.10 Agarose-Gelelektrophorese	48
3.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
3.12 Herstellung eines T-Überhangvektors	48
3.13 Restriktion mittels Typ-II-Endonukleasen	49
3.14 Ligation mittels der T4-DNA-Ligase	50
3.15 Klonierung in das pGEM-T Easy Vektor System	50

3.16 Klonierung in das pRSET B Vektor System	51
3.17 CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	51
3.17.1 Herstellung kompetenter Zellen	51
3.17.2 Transformation von <i>E. coli</i> DH5α	51
3.17.3 Transformation von <i>E. coli</i> in BL21(DE3)pLysS	52
3.17.4 Insertionskontrolle	52
3.18 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	53
3.18.1 Plasmid-Minipräparation	53
3.18.2 Plasmid-Minipräparation mit einem Kit	53
3.19 DNA-Sequenzierung	53
3.19.1 Probenaufbereitung	54
3.19.2 Sequenziergel	55
3.19.3 DNA-Sequenzierung bei MWG (mwg-biotech.) und GATC	55
3.19.4 Auswertung der Sequenzierdaten	56
3.20 Heterologe Expression	57
4. Ergebnisse	58
4.1 Isolierung von RNA und Poly(A ⁺)-mRNA	58
4.2 Reverse Transkription	58
4.3 Design von degenerierten Primern	59
4.4 Amplifikation von BUS-Fragmenten aus <i>H. calycinum</i> mit degenerierten Primern	60
4.4.1 Ergebnisse der PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR)	62
4.4.2 Klonierung und Sequenzierung der gewonnenen Fragmente	63
4.4.3 Sequenz-Analyse der vier gewonnenen cDNA-Fragmente	64
4.4.3.1 cDNA Fragment 1	64
4.4.3.2 cDNA Fragment 2	64
4.4.3.3 cDNA Fragment 3	64
4.4.3.4 cDNA Fragment 4	65
4.4.4 Fragment-Vergleich der abgeleiteten Aminosäuren-Sequenzen	66
4.5 Amplifikation der fehlenden 5' und 3'-cDNA-Enden	68
4.5.1 3'-RACE-PCR	68
4.5.2 5'-RACE-PCR	71
4.6 Fragment-Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen nach RACE-PCR	74
4.7 TAIL-PCR	75
4.8 Volllänge-cDNA 1 aus <i>H. calycinum</i>	77
4.9 5'-RACE-PCR bei <i>H. perforatum</i> auf Basis der cDNA-Fragmente aus <i>H. calycinum</i>	80
4.10 Offener Leserahmen der Volllänge-cDNA 1 aus <i>H. calycinum</i>	83
4.10.1 Aminosäuren-Sequenz des cDNA 1-ORF aus <i>H. calycinum</i>	83
4.10.2 Expressionsprimer-Design für ORF 1	84
4.10.3 ORF 1-Amplifikation aus <i>H. perforatum</i> und <i>H. calycinum</i> mit <i>Pfu</i> -Polymerase	84
4.10.4 Restriktions-Verdau der ORFs 1 und pRSET B	85
4.10.5 Ligation	86
4.10.6 Transformation von DH5α _T und BL21	86
4.10.7 ORF 1-Amplifikation aus <i>H. perforatum</i> und <i>H. calycinum</i> mit <i>Pfx</i> -Polymerase	86

5. Diskussion	88
5.1 Johanniskraut (<i>Hypericum perforatum</i>)	88
5.2 Hyperforin	88
5.2.1 Hyperforin-Gehalt	88
5.2.1.1 Intakte <i>H. perforatum</i> -Pflanzen	88
5.2.1.2 Zell- und Kalluskulturen von <i>H. perforatum</i>	89
5.2.1.3 Intakte <i>H. calycinum</i> –Pflanzen	90
5.2.1.4 Zellkulturen von <i>H. calycinum</i>	91
5.2.2 Hyperforin-Biosynthese in <i>Hypericum</i>	93
5.3 Polyketid-Synthasen Typ III aus <i>Hypericum</i>	94
5.4 Sequenzähnlichkeiten	97
5.5 cDNA Klonierung der Isobutyrophenon-Synthase	98
6. Zusammenfassung	100
7. Literaturverzeichnis	101
8. Anhang	113
9. Lebenslauf	117

Tabellen

- Tab. 1.1: Wichtigste Gruppen pflanzlicher Sekundärverbindungen
- Tab. 1.2: Sekundärmetabolite und ihr Nutzen für die Pflanze
- Tab. 1.3: *Hypericum perforatum*-Eigenschaften
- Tab. 1.4: Johanniskraut - Inhaltsstoffe
- Tab. 1.5: Antimikrobielle Aktivität von Hyperforin, (Reichling et al., 2001)
- Tab. 1.6: Beispiele für Polyketide (die Startersubstrate liegen als CoA-Ester, die Acetyl-Einheiten als Malonyl-CoA vor)
- Tab. 3.1: Einige allgemeine Richtlinien für das Design von Standard-PCR-Primern
- Tab. 3.2: Berechnung der Plasmid-DNA Konzentration
- Tab. 3.3: 3'- und 5'- RACE-cDNA Synthese mittels M-MuLV Reverse Transcriptase
- Tab. 3.4: 3'- und 5'- RACE-cDNA-Synthese mittels PrimeScript™ Reverse Transcriptase
- Tab. 3.5: Vergleichung von *Taq*-Polymerase und *Pfu*-Polymerase
- Tab. 3.6: Standard-PCR-Reaktion
- Tab. 3.7: Standard-PCR-Programm
- Tab. 3.8: *Pfu*-PCR-Reaktion
- Tab. 3.9: *Pfu*-PCR-Programm
- Tab. 3.10: Standard Touch-Down-PCR Programm
- Tab. 3.11: TAIL-PCR Programm
- Tab. 3.12: Tabelle benutzt für die 1 %-Gel-Herstellung mit Ethidiumbromid
- Tab. 3.13: Standard-Restriktionsansatz
- Tab. 3.14: Beispiel Restriktionsverdau: *EcoR* I
- Tab. 3.15: Beispiel für einen Doppel-Restriktions-Verdau: *KpN* I / *Nhe* I
- Tab. 3.16: Ligationsansatz mittels T4-DNA-Ligase
- Tab. 3.17: Sequenzierungsansatz
- Tab. 3.18: Thermocycler-Programm
- Tab. 3.19: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen zur DNA-Sequenzierung
- Tab. 3.20: Sequenzierung bei MWG
- Tab. 3.21: Sequenzierung bei GATC
- Tab. 3.22: Softwareprogramme von Lasergene 99 DNA STAR
- Tab. 3.23: BLAST
- Tab. 4.1: Prozentuale Identität von ausgewählten PKS auf Aminosäure-Ebene
- Tab. 4.2: Mögliche Kombinationen von degenerierten und RACE-Primern
- Tab. 4.3: Standard-PCR-Programm
- Tab. 4.4: Standard Touchdown-PCR-Programm
- Tab. 4.5: Ergebnisse der PCR mit degenerierten und RACE-Primern
- Tab. 4.6: Prozentuale Identität der ausgewählten PKS und neu klonierten Fragmente auf Aminosäure-Ebene
- Tab. 4.7: Prozentuale Identität von CHS und BPS aus *H. perforatum* und *H. calycinum* (Klingauf, 2004) mit den neu klonierten Fragmenten aus *H. calycinum* auf Aminosäure-Ebene
- Tab. 4.8: Prozentuale Identität von CHS und BPS aus *H. perforatum* und *H. calycinum* mit den durch RACE-PCR verlängerten cDNA-Fragmenten auf Aminosäure-Ebene
- Tab. 4.9: TAIL-PCR-Programm
- Tab. 4.10: Aminosäure-Ebene: Prozentuale Identität von ORF 1 aus *H. calycinum* mit BPS und CHS aus *H. perforatum* und *H. calycinum*
- Tab. 4.11: Nukleotid-Ebene: Prozentuale Identität von ORF 1 aus *H. calycinum* mit BPS und CHS aus *H. perforatum* und *H. calycinum*
- Tab. 4.12: Eigenschaften des ORF 1

Tab. 4.13: Expressions-Primer für die Amplifikation des cDNA 1-ORF

Tab. 4.14: Restriktionsschnittstellen der Expressionsprimer

Tab. 4.15: *Pfx*-PCR-Reaktion

Tab. 4.16: *Pfx*-PCR-Programm

Tab. 5.1: Prozentuale Identität von ausgewählten PKS auf Aminosäure-Ebene

Abbildungen

- Abb. 1.1: Biologische Notwendigkeit und medizinischer Nutzen des Sekundärstoffwechsels (Hartmann und Ober, 2003)
- Abb. 1.2 Tabletten mit Johanniskraut-Extrakt
- Abb. 1.3 Wirkmechanismus von Johanniskraut-Zubereitungen
- Abb. 1.4: Tüpfel-Johanniskraut (*Hypericum perforatum*; Clusiaceae)
- Abb. 1.5: *H. perforatum*-Blatt mit Sekretbehältern
- Abb. 1.6: Roter Saft beim Zerreiben der Blüten und Knospen von *H. perforatum*
- Abb. 1.7: $R_1 = R_2 = CH_3$ Hypericin; $R_1 = CH_3$; $R_2 = CH_2OH$ Pseudohypericin
- Abb. 1.8: Xanthon-Derivate
- Abb. 1.9: Grundstruktur der Flavonoide (A) und Rutin (B)
- Abb. 1.10: $R = H$ Hyperforin; $R = CH_3$ Adhyperforin
- Abb. 1.11: *Hypericum calycinum*
- Abb. 1.12: Vorgeschlagener Hyperforin-Biosyntheseweg (Beerhues, 2006)
- Abb. 1.13: Reaktion der Isobutyrophenon-Synthase (BUS)
- Abb. 1.14: Der erste Prenylierungsschritt in der Hyperforin-Biosynthese mit DMAPP als Prenyldonor (Boubakir et al., 2005)
- Abb. 1.15: Tetraketid-Biosynthese
- Abb. 1.16: Zyklisierung eines Tetraketids (Claisen Kondensation: C-6→C-1-Verknüpfung)
- Abb. 1.17: Reaktion der Chalkon-Synthase (CHS)
- Abb. 1.18: Reaktion der Stilben-Synthase (STS)
- Abb. 1.19: Von Biphenyl-Synthase (BIS) katalysierte PKS III Reaktion
- Abb. 1.20: Von Benzophenon-Synthase (BPS) katalysierte PKS III Reaktion
- Abb. 1.21: Valerophenon-Synthase (VPS) katalysierte PKS III Reaktion
- Abb. 1.22: Isobutyrophenon-Synthase (BUS) katalysierte PKS III Reaktion
- Abb. 2.1: *Hypericum calycinum*
- Abb. 2.2: *Hypericum perforatum*
- Abb. 2.3: Kalluskultur von *H. calycinum* auf LS-Medium
- Abb. 2.4: Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* in LS-Medium
- Abb. 2.5: Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* in BDS
- Abb. 4.1: Prinzip der 5'-RACE-PCR
- Abb. 4.2: Prinzip der 3'-RACE-PCR
- Abb. 4.3: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von fünf ausgewählten PKS III (BPS und CHS aus *H. androsaemum*, CHS aus *H. perforatum*, VPS aus *Humulus lupulus* sowie *Psilotum nudum*)
- Abb. 4.4: Positionen der erzeugten degenerierten Primer
- Abb. 4.5: Schema der PCR mit RACE- und degenerierten sense-Primern
- Abb. 4.6: Schema der PCR mit RACE- und degenerierten reverse-Primern
- Abb. 4.7: Schema der PCR mit degenerierten sense- und degenerierten reverse-Primern
- Abb. 4.8: pGEM®-T Easy Vektor-Karte und multiple Klonierungsstelle
- Abb. 4.9: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich von cDNA Fragment 1
- Abb. 4.10: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich von cDNA Fragment 2
- Abb. 4.11: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich von cDNA Fragment 3
- Abb. 4.12: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich von cDNA-Fragment 4
- Abb. 4.13: Vergleich der neuen Aminosäuren-Sequenzen (136 AA → C-terminal) mit fünf ausgewählten PKS III

- Abb. 4.14: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von BPS und CHS aus *H. calycinum* und *H. perforatum* (Klingauf, 2004) mit den neu klonierten cDNA-Fragmenten aus *H. calycinum*
- Abb. 4.15: Schema der 3'-RACE-PCR mit RACE- und genspezifischen sense-Primern
- Abb. 4.16: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des 3'-cDNA-Fragments 1
- Abb. 4.17: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des 3'-cDNA-Fragments 2
- Abb. 4.18: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des 3'-cDNA-Fragments 3
- Abb. 4.19: Schema der 5'-RACE-PCR mit RACE- und reversen genspezifischen Primern
- Abb. 4.20: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des 5'-verlängerten cDNA-Fragments 1
- Abb. 4.21: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen der nach RACE-PCR vorliegenden cDNA-Fragmente 1, 2, und 4 aus *H. calycinum* mit den C-terminalen Bereichen von BPS und CHS aus *H. calycinum* und *H. perforatum*
- Abb. 4.22: Prinzip der 5'-TAIL-PCR
- Abb. 4.23: Prinzip der 3'-TAIL-PCR
- Abb. 4.24: 5CHSDpsense und 5BPSdpsense Primer-Design
- Abb. 4.25: 5'-TAIL-PCR mit 5CHSDpsense / 5BPSdpsense und zwei geschachtelten genspezifischen reverse-Primern (NP1 und NP2)
- Abb. 4.26: 5'-TAIL-PCR mit den Primern 5CHSDpsense und F1REV3 / F1REV4
- Abb. 4.27: Vergleich der Nukleotid-Sequenzen der beiden 5'-Enden für cDNA-Fragment 1, die durch TAIL-PCR aus *H. calycinum* gewonnen wurden
- Abb. 4.28: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich der Volllänge-cDNA 1 aus *H. calycinum*
- Abb. 4.29: Vergleich auf Aminosäuren-Ebene von ORF 1 aus *H. calycinum* mit BPS und CHS aus *H. perforatum* und *H. calycinum*
- Abb. 4.30: Vergleich auf Nukleotid-Ebene von ORF 1 aus *H. calycinum* mit BPS und CHS aus *H. perforatum* und *H. calycinum*
- Abb. 4.31: Vergleich auf Nukleotid-Ebene von ORF 1 aus *H. calycinum* mit cDNA-Fragment 1-1 aus *H. perforatum*
- Abb. 4.32: Vergleich auf Nukleotid-Ebene von ORF 1 aus *H. calycinum* mit cDNA-Fragment 1-2 aus *H. perforatum*
- Abb. 4.33: Vergleich auf Nukleotid-Ebene von ORF 1 aus *H. calycinum* mit den aufeinander folgenden cDNA-Fragmenten 1-1 und 1-2 aus *H. perforatum*
- Abb. 4.34: ORF 1 aus *H. calycinum*
- Abb. 4.35: Aminosäuren-Sequenz des ORF 1 aus *H. calycinum*
- Abb. 4.36: Agarose-Gelelektrophorese der mit *Pfu*-Polymerase reamplifizierten ORFs 1 aus *H. perforatum* und *H. calycinum*
- Abb. 4.37: Expressionsvektor pRSET B
- Abb. 4.38: Agarose-Gelelektrophorese des mit *NheI* und *KpnI* verdauten pRSET B-Vektors, der die ORFs 1 aus *H. perforatum* und *H. calycinum* enthielt
- Abb. 4.39: Agarose-Gelelektrophorese des mit *Pfx*-Polymerase reamplifizierten ORFs 1 aus *H. calycinum*
- Abb. 5.1: Gehalt an Hyperforinen und Flavonoiden in sich entwickelnden Knospen von *H. perforatum* (Tekelova et al., 2000)
- Abb. 5.2: Vorgeschlagener Verzweigungspunkt in der Biosynthese der Hyperforine, der zur Bildung von Hyperforin und Secohyperforin führt (Charchoglyan et al., 2007)
- Abb. 5.3: Flavonoide (1,2) und dearomatisierte isoprenylierte Phloroglucinole (3,4,5,6,7) aus *H. calycinum* (Gronquist et al., 2001)
- Abb. 5.4: Wachstum und Adhyperforin-Bildung von *H. calycinum*-Zellkulturen (Zapletalová, 1999; Klingauf, 2005)

- Abb. 5.5: Veränderung der spezifischen Aktivitäten der Isobutyrophenon-Synthase, Benzophenon-Synthase und Chalkon-Synthase während des Wachstums von *H. calycinum*-Zellkulturen (Klingauf et al., 2005)
- Abb. 5.6: Der erste Prenylierungsschritt in der Hyperforin-Biosynthese mit DMAPP als Prenyldonor (Boubakir et al., 2005)
- Abb. 5.7: Adhyperforin-Bildung und Veränderung der spezifischen Prenyltransferase-Aktivität während des Zellkulturwachstums von *H. calycinum* (Boubakir et al., 2005)
- Abb. 5.8: Vorgeschlagener Hyperforin-Biosyntheseweg (Beerhues, 2006)
- Abb. 5.9: Reaktion der Isobutyrophenon-Synthase (BUS; Klingauf et al., 2005).
- Abb. 5.10: Reaktion der Chalkon-Synthase
- Abb. 5.11: Reaktionen von drei Typ III Polyketid-Synthasen aus *Hypericum*-Arten (Klingauf et al., 2005)
- Abb. 5.12 Biosynthese von Benzophenonen und Xanthonen mit Beispielen aktiver Verbindungen (Beerhues and Liu, 2009)
- Abb. 5.13: Biosynthese von Bittersäuren im Hopfen (Zuurbier et al. 1998)
- Abb. 5.14: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von fünf ausgewählten PKS (BPS und CHS aus *H. androsaemum*, CHS aus *H. perforatum*, VPS aus *Humulus lupulus* und *Psilotum nudum*)
- Abb. 8.1: Basen - und Aminosäuresequenz des ORF 1 aus *H. calycinum*
- Abb. 8.2: Basen - und Aminosäuresequenz des Fragments 2 aus *H. calycinum*
- Abb. 8.3: Basen - und Aminosäuresequenz des Fragments 4 aus *H. calycinum*
- Abb. 8.4: Basen - und Aminosäuresequenz des Fragments 1-1 aus *H. perforatum*
- Abb. 8.5: Basen - und Aminosäuresequenz des Fragments 1-2 aus *H. perforatum*

Abkürzungen

AA	Aminosäure / Aminosäuren
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BDS	modifiziertes B5-Medium, nach Dunstan und Short (1977)
β-ME	β-Mercaptoethanol
BIS	Biphenyl-Synthase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BPS	Benzophenon-Synthase
BUS	Isobutyrophenon-Synthase
°C	Grad Celsius
cDNA	mRNA-komplementäre DNA
CHS	Chalcon-Synthase
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTPs	Dye-labeled chain-terminating nucleotides
dH₂O	destilliertes Wasser
DP	Degenerierte Primer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DOP-PCR	Degenerated Oligonucleotide Primed PCR
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
G	Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GPP	Geranyl-Diphosphat
GSP	Genspezifischer Primer
h	Stunde
<i>H. calycinum</i>	<i>Hypericum calycinum</i>
<i>H. perforatum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSCoA	Freies Coenzym A
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
LB	Lucia-Bertani-Medium
LS	Linsmeier-Skoog-Medium
M	mol/l
MCS	Multiple cloning site
MeOH	Methanol

min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
M-MLV	Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
μ	micro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
NCBI	National Center of Biological Information
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PKS	Polyketid-Synthase
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RACE_{long+short}	RACE anchor primer
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkriptase
SDS	Sodium dodecyl sulphate
sec	Sekunde
SMART-RACE	Switching Mechanism At 5' end of RNA Template-RACE
STS	Stilben-Synthase
TAIL-PCR	Thermal Asymmetric Interlaced-PCR
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TdT	Terminale Transferase
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	total RNA
U	Unit (Aktivitätseinheit von Enzymen) oder Umdrehungen
ÜNK	Übernachtkultur
VPS	Valerophenon-Synthase
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
V	Volumen, Volt
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid
x g	-fache Erdbeschleunigung
g	Gramm

Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Asparagin	Asn	N	Lysin	Lys	K
Asparaginsäure	Asp	D	Methionin	Met	M
Arginin	Arg	R	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Nukleinsäuren

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

Nomenklatur für Wobble-Basen zur Konstruktion degenerierter PCR-Primer

Buchstaben-Code	Basen
B	C oder G oder T
D	A oder G oder T
H	A oder C oder T
K	G oder T
M	A oder C
N	A oder C oder G oder T
R	A oder G
S	C oder G
V	A oder C oder G
W	A oder T
Y	C oder T

1. Einleitung

Zubereitungen aus dem Tüpfel-Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) werden zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen eingesetzt (Müller und Holoubek, 2003). An ihrer Wirkung ist maßgeblich das Phoroglucin-Derivat Hyperforin beteiligt. Die Biosynthese von Hyperforinen als Sekundärmetaboliten wurde in der vorliegenden Arbeit an Pflanzen von *Hypericum perforatum* und *H. calycinum* sowie an Zellkulturen von *H. calycinum* untersucht.

1.1 Sekundäre Pflanzenstoffe

Der pflanzliche Organismus bildet eine Fülle von verschiedenen Substanzen. Diese lassen sich in Primär- und Sekundärstoffe unterscheiden (Hartmann und Ober, 2003; Hartmann, 2007). Erst genannte sind ubiquitär verbreitet und für Wachstum und Differenzierung eines Organismus unentbehrlich. Sie schließen z.B. Kohlenhydrate, Lipide und Aminosäuren ein. Die Produkte des Sekundärstoffwechsels hingegen sind strukturell äußerst vielfältig und auf bestimmte Pflanzentaxa beschränkt, oftmals sogar artspezifisch. Sie sind nicht in die lebensnotwendigen Stoffwechselwege involviert.

Sekundärverbindungen werden nur in speziellen Zelltypen hergestellt, haben aber trotzdem eine Bedeutung für die gesamte Pflanze. Sie sind für die Pflanze lebenswichtig und haben häufig auch einen hohen Stellenwert für den Menschen. Oft werden Pflanzen nur aufgrund dieser Verbindungen angebaut, z.B. die Arzneipflanzen. Die wichtigsten Gruppen pflanzlicher Sekundärverbindungen sind nach ihrer chemischen Struktur in Tab. 1.1 aufgeführt.

Tab. 1.1: Wichtigste Gruppen pflanzlicher Sekundärverbindungen

Klasse	Beispiele
Phenole	einfache Phenole Polyphenole Xanthone Flavonoide Stilbene
Isoprenoide	Monoterpene Sesquiterpene Steroide Carotinoide
Alkaloide	Morphin Koffein Nikotin

Die in den Pflanzen oft in erheblicher Menge gebildeten Sekundärstoffe besitzen mannigfaltige, teils noch unbekannte Aufgaben. Viele pflanzliche Sekundärstoffe dienen der Pflanze als effektive chemische Abwehrstoffe gegen Herbivoren und Pathogene. Andererseits locken Sekundärmetabolite als Farb- und Aromastoffe pollenverbreitende Insekten und samenverbreitende Fruchtfresser an. Andere sind an Differenzierungsvorgängen beteiligt oder haben Signalfunktion (Tab. 1.2).

Tab. 1.2: Sekundärmetabolite und ihr Nutzen für die Pflanze

Nutzen	Beispiele
Abwehr von Pathogenen	Isoflavonoide Biphenyle
Abwehr von Herbivoren	Tannine Alkaloide Terpene
Schutz vor UV-Strahlung und Starklicht	Flavonoide Carotinoide
Anlockung von Bestäubern und Samenverbreitern	Anthocyane Carotinoide Terpene
Verdunstungsschutz	Suberin Cutin
Mechanische Festigung	Lignine

Jede Art produziert ein anderes, charakteristisches Spektrum an Naturstoffen und verschafft sich auf diese Weise gegebenenfalls einen Standortvorteil gegenüber anderen Pflanzen, was ihr Fortbestehen in der Umwelt sichert (Hartmann, 2007).

Der Sekundärstoffwechsel dient der Pflanze, wie oben festgestellt, zur chemischen Abwehr von Herbivoren und phytopathogenen Mikroorganismen. Der Mensch nutzt das reiche Wirkstoffpotenzial in Pharmazie und Medizin (Abb. 1.1). Die enorme Vielfalt dieser Substanzen und ihre pharmakologischen Eigenschaften machen sie für die pharmazeutische Forschung interessant.

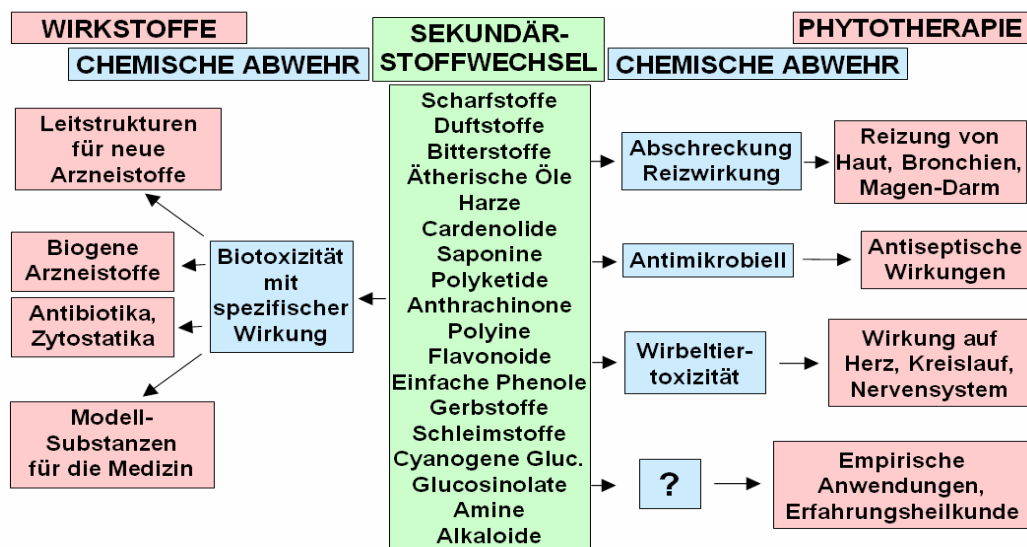


Abb. 1.1: Biologische Notwendigkeit und medizinischer Nutzen des Sekundärstoffwechsels (Hartmann und Ober, 2003)

1.2 Johanniskraut-Extrakt als Antidepressivum

Ein interessantes Beispiel für die medizinische Verwendung einer Pflanze auf Grund ihrer Sekundärmetabolite ist das Johanniskraut (*H. perforatum*), dessen Extrakte antidepressiv wirksam sind.

Die Depression ist die am häufigsten auftretende psychische Erkrankung. Depressiv bezeichnet einen Zustand psychischer Niedergeschlagenheit. Depression wird definiert als wochenlanger Rückzug, bei dem „die Traurigkeit ihren Sinn verliert, Anstoß zur Neuorientierung zu geben“ (Gastpar, 1998). Depressionen sind multifaktorielle Erkrankungen, die häufig im Zusammenhang mit anderen psychischen und internistischen Leiden auftreten. Sie werden in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt: leicht, mittelschwer und schwer.

In jedem Fall ist die Depression therapiebedürftig und kann in der Regel gut behandelt werden. Infrage kommen die Psychotherapie, physikalische Maßnahmen oder eine medikamentöse Behandlung mit Antidepressiva. Antidepressiva sind Medikamente, die hauptsächlich gegen Depressionen eingesetzt werden. Die antidepressiv wirksamen Substanzklassen unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur und ihrem biochemischen Wirkmechanismus (Trizyklische Antidepressiva, Selektive Wiederaufnahme-Hemmer, andere monoaminerge Antidepressiva, Phytopharmaka, Phasenprophylaktika mit antidepressiver Wirkung). Die meisten Antidepressiva führen zu einer vermehrten Bereitstellung von Neurotransmittern wie Noradrenalin und Serotonin an den Synapsen und verursachen eine Stimmungsaufhellung. Eine Beeinträchtigung der synaptischen Kommunikation von Neurotransmittern im zentralen Nervensystem spielt eine wichtige Rolle (Gastpar, 1998).

Johanniskraut-Präparate (Abb. 1.2) zählen zu den am besten geprüften Phytopharmaka und sind Mittel der ersten Wahl zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen. Auch sie hemmen die Wiederaufnahme von Neurotransmittern und führen bei den behandelten Patienten nach einer Verzögerungszeit zu einer Stimmungsaufhellung (Abb. 1.3; Philipp et al., 1999).



Abb. 1.2 Tabletten mit Johanniskraut-Extrakt

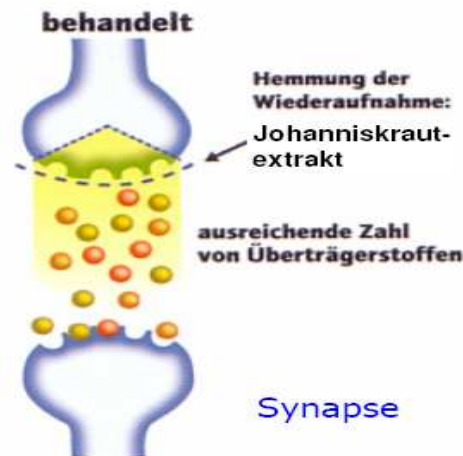


Abb. 1.3 Wirkmechanismus von Johanniskraut-Zubereitungen

Bis Herbst 2002 wurden 36 kontrollierte Doppelblind-Studien an Patienten mit leichten bis mittelschweren Depressionen publiziert (Schulz, 2003). Sie haben die Wirksamkeit gezeigt sowie die gute Verträglichkeit und die geringe Quote an unerwünschten Wirkungen belegt. Linde et al. (2008) fassen in einer Metaanalyse die Ergebnisse von insgesamt 29 kontrollierten klinischen Studien zur Wirksamkeit von standardisierten Johanniskraut-Extrakten zusammen. Die Autoren kommen zu drei Schlussfolgerungen: *Hypericum*-Extrakte sind wirksamer als Placebo, unterscheiden sich nicht in der Wirksamkeit von Standard-Antidepressiva und haben weniger Nebenwirkungen als Standard-Antidepressiva.

Eine Tagesdosis von 300 mg bis 900 mg Gesamtextrakt wird empfohlen, wobei ähnlich zu synthetischen Antidepressiva mit einer Latenzzeit von 2 - 3 Wochen zu rechnen ist (Müller, 2003).

Insbesondere bei gleichzeitiger Einnahme anderer Medikamente sollte man vorher Rücksprache mit dem verordnenden Arzt halten. Durch die Induktion von Cytochrom P450-Enzymen, insbesondere CYP3A4, in den Leberzellen und des Transporterproteins p-Glykoprotein werden viele andere Medikamente schneller abgebaut und in ihrer Wirkung abgeschwächt, wobei noch nicht abschließend bekannt ist, welche Inhaltsstoffe für diese Wirkungen verantwortlich sind (Moore et al., 2000). Die dramatischsten diagnostizierten Effekte zeigten sich bei Cyclosporin (Breidenbach et al., 2000), Protease-Hemmern (Piscitelli et al., 2000) und Zytostatika (Mathijssen et al., 2002). Wechselwirkungen beobachtet man aber auch mit Marcumar, Theophyllin, Midazolam, Digoxin und der Antibabypille. Besondere Erwähnung verdienen Interaktionen von Johanniskraut mit anderen Antidepressiva. So konnte gezeigt werden, dass Johanniskraut die Wirkung von bestimmten trizyklischen Antidepressiva, z.B. Amitriptylin und Nortriptylin, durch Beschleunigung ihres Abbaus deutlich verringert. Bei folgenden Substanzen wird durch Wechselwirkung mit Johanniskraut die Serotoninkonzentration im Zentralnervensystem erhöht, was unter Umständen zu einem lebensbedrohlichen Serotonin-Syndrom führt: Fluoxetin, Fluvoxamin, Paroxetin, Sertralin, Citalopram, Mirtazapin, Venlafaxin, Metoclopramid und Trazodon u.a. Nicht unerwähnt sollte auch bleiben, dass sich die Lichtempfindlichkeit durch die Einnahme von Johanniskrautextrakt erhöht. In Studien wird geprüft, den Wirkstoff Hypericin, der neben Hyperforin im Johanniskraut vorkommt, auch als Sensitizer für die photodynamische Therapie einzusetzen.

Da moderne synthetische Antidepressiva deutlich teurer und reicher an Nebenwirkungen sind, zählen Johanniskraut-Extrakte unter wirtschaftlichen wie auch ethischen Gesichtspunkten bei der Behandlung leichter und mittelschwerer Depressionen zu den besten zur Zeit verfügbaren Antidepressiva (Schulz, 2003).

1.3 *Hypericum perforatum*

H. perforatum ist der bekannteste Vertreter der weltweit verbreiteten Pflanzenfamilie Clusiaceae, früher als Hypericaceae bezeichnet (Abb. 1.4).



Abb. 1.4: Tüpfel-Johanniskraut (*Hypericum perforatum*; Clusiaceae)

1.3.1 Geschichte

Johanniskraut ist seit der Antike als Heilpflanze bekannt und wurde bereits von Hippokrates, Paracelsus und später von Kräuterbuchautoren des Mittelalters beschrieben. Plinius der Ältere (23 - 79 n. Chr.) erwähnt die Nutzung des Johanniskrauts bei der Behandlung von Brandwunden. Dioskurides (77 n. Chr.) beschrieb die wundheilungsfördernde, antipyretische und diuretische Wirkung eines Krauts, das er als hypereikon bezeichnete. Die Herkunft des lateinischen Namens „*Hypericum*“ leitet sich aus den zwei griechischen Wörtern *hyper* (über, oberhalb) und *eikon* (Bild) ab (Czygan, 1993, 2003). Diese Namensgebung stammt von der Tradition, das Tüpfel-Johanniskraut am Johannistag über einem Bild anzubringen, um so Schlechtes abzuwehren. Paracelsus kannte die Pflanze und nutzte sie schon zur Behebung seelischer Störungen. 1525 beschrieb er in seinem Buch „Von den natürlichen Dingen“ als einer der ersten die pharmakologischen Eigenschaften des Johanniskrauts in wissenschaftlicher, rationaler Weise. Er erkannte den lindernden Einfluss auf Menschen mit Verzweiflung und Trübsinn. Seit dieser Zeit wurde die Pflanze immer mehr zu psychotherapeutischen Zwecken eingesetzt, was die Empfehlungen in alten Kräuterbüchern belegen. Der wissenschaftliche Name *Hypericum perforatum*, wie wir ihn heute gebrauchen, wurde von Carl von Linné 1753 in seinem Werk „Species plantarum“ aufgeführt. Der Gattungsname leitet sich von *hyper* = auf, über und *ereikon* = Heide ab und bedeutet auf der Heide wachsendes Kraut oder auch größer als Heide wachsendes Kraut (Hölzl et al., 1994). Der Artnamen *perforatum* bezieht sich auf die durchscheinend punktierten Blätter, die wegen der vielen Sekretbehälter (Abb. 1.5) im Gegenlicht durchstoßen aussehen (Czygan, 1997, 2003). Die deutsche Bezeichnung Johanniskraut bezieht sich auf den Johannistag am 24. Juni, da die Pflanze in diesem Zeitraum zu blühen beginnt (Johanniskraut, Sonnenwendkraut). Der

als gleichwertig benutzte Name Hartheu geht auf den stark verholzten Stängel zurück, der schon von Hildegard von Bingen (1088 - 1180) erwähnt wurde. Beim Zerreiben der Blüten und Knospen tritt ein roter Saft aus (Abb. 1.6), weshalb die Pflanze auch als Blutkraut, Hexenkraut, Mannskraut, Herrgottsblut oder Johannisblut bezeichnet wurde.



Abb. 1.5: *H. perforatum*-Blatt mit Sekretbehältern



Abb. 1.6: Roter Saft beim Zerreiben der Blüten und Knospen von *H. perforatum*

1.3.2 Botanik

Die Johanniskräuter (*Hypericum*) sind eine Pflanzengattung innerhalb der Johanniskrautgewächse. Die Gattung umfasst rund 450 Arten. Bekannt ist vor allem das medizinisch genutzte „Echte Johanniskraut“ (*Hypericum perforatum*), auch Tüpfel-Johanniskraut oder Tüpfel-Hartheu genannt. Die wichtigen Eigenschaften von *Hypericum perforatum* sind in Tab. 1.3 zusammengefasst.

Tab. 1.3: *Hypericum perforatum*-Eigenschaften

Verbreitung	Europa; Nord-Afrika; West-Asien
Höhe	30 - 60 cm
Blütezeit	Juni - August
Standort	Sonniger bis absonniger Standort bevorzugt.
Merkmale	Zahlreiche 2 - 2,5 cm große Blüten in Rispen an einem verzweigten Stängel, 5 Kelch- und 5 Blütenblätter, zahlreiche Staubblätter in 3 Gruppen zusammenstehend, Blütenblätter im Knospenstadium rötlich und gedreht; gegenständige, etwa eiförmige Blätter mit deutlich sichtbaren, durchscheinenden Punkten; Frucht: Kapseln, aufspringend.
Vorkommen	Lichte Wälder, Gebüsche, Wegränder und Trockenrasen; auf tiefgründigen, nährstoffarmen, trockenen Böden; sehr häufig.
Wissenswertes	Seine Bedeutung im mittelalterlichen Volksglauben verdankt das Tüpfel-Johanniskraut dem roten Farbstoff. Dieses „Johannisblut“ tritt aus, wenn die Blüten zerrieben werden. Daher diente das Kraut für allerlei Zauber und die Abwehr von Hexen. Johanniskrautöl hilft gegen Verbrennung (Sonnenbrand!) und wird bei leichten Depressionen verwendet. Weidendes Vieh kann sich an den blühenden Pflanzen vergiften („Lichtkrankheit“).
Droge	Hyperici herba

1.3.3 Inhaltsstoffe und Wirkungen

H. perforatum enthält mehrere Gruppen pharmakologisch interessanter Sekundärstoffe (Tab. 1.4).

Tab. 1.4: Johanniskraut - Inhaltsstoffe

Inhaltsstoffgruppe	Beispiele	Wirkungen
Flavonoide	Quercetin, Rutin, Quercetinglykoside: Hyperosid, Quercetrin	antidepressiv
Biflavonoide	Amentoflavon	sedativ
Acylphloroglucine	Hyperforin, Adhyperforin	antidepressiv, antibakteriell
Naphthodianthrone	Hypericin, Pseudohypericin	antidepressiv, antiviral, photosensibilisierend
Xanthone	1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon, Kielcorin	antidepressiv
Ätherisches Öl	2-Methyl-3-buten-2-ol	sedativ

Johanniskraut-Extrakte zeigen auf Grund des umfangreichen Inhaltsstoffspektrums eine Reihe pharmakologischer Eigenschaften und sind daher in den Fokus des pharmazeutischen Interesses gerückt. Die Droge, Hyperici herba, wurde von der Aufbereitungskommission E des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte positiv bewertet. Als

Anwendungsgebiete werden der innerliche Einsatz bei psychovegetativen Störungen, depressiven Verstimmungszuständen, Angst und/oder nervöser Unruhe genannt. Äußerlich können Johanniskraut-Zubereitungen zur Behandlung von Verbrennungen, Ekzemen und stumpfen Traumata eingesetzt werden.

1.3.3.1 Hypericine

Lange Zeit galten die Hypericine (Abb.1.7) als die Hauptwirksubstanzen von Johanniskraut-Zubereitungen. Dieser Befund bestätigte sich aber nicht (Müller, 1998). Für Hypericin wurde eine irreversible Hemmung der Monoaminoxidase A als Wirkmechanismus beschrieben (Suzuki et al., 1984), was auch für einige synthetische Antidepressiva gilt. Dies konnte aber in späteren Untersuchungen widerlegt werden (Sparrenberg, 1993). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass der gewünschte Effekt erst bei Konzentrationen eintritt, die in den erhältlichen Extrakten nicht erreicht werden (Bladt und Wagner, 1994). Dagegen sind eine antivirale Wirkung und der cytotoxische Effekt auf Tumorzellen belegt (Hadjur et al., 1995, Vandenbogaerde et al., 1998).

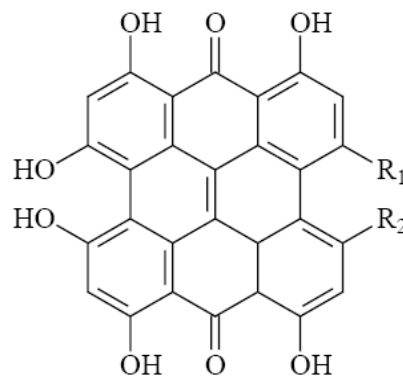


Abb. 1.7: $R_1 = R_2 = CH_3$ Hypericin; $R_1 = CH_3$; $R_2 = CH_2OH$ Pseudohypericin

1.3.3.2 Xanthone

Xanthone (Abb. 1.8) sind hauptsächlich in den Familien *Clusiaceae* und *Gentianaceae* verbreitet. Ihre Vorstufe sind Benzophenone. Sie besitzen unterschiedlichste pharmakologisch bedeutende Eigenschaften. So konnten antimikrobielle (Nkengfack et al., 2002), antimutagene (Schimmer und Mauthner, 1996), antiretrovirale (Groweiss et al., 2000) sowie zytotoxische und antitumorale (Abou Shoer et al., 1988) Wirkungen gezeigt werden. Xanthone sind potente Inhibitoren der Monoaminoxidase A und B (Suzuki et al., 1981). Obgleich dieser Effekt bei der Behandlung von Depressionen relevant ist, tragen die Xanthone wohl nicht zur Wirkung von *H. perforatum* bei. Verwendung findet hier das Kraut der Pflanze, die Xanthone sind jedoch hauptsächlich in der Wurzel lokalisiert (Greenson et al., 2001). Daneben konnten antimykotische Wirkungen für Xanthone gefunden werden (Morel et al., 2002). Ebenso geht von 1,3,7-trioxydierten und in Position 2 und 8 prenylierten Xanthonen eine Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* aus (Hay et al., 2004). Darüber hinaus wurden auch vasorelaxierende Effekte für Xanthone beschrieben (Chericoni et al., 2003). γ -Mangostin, ein Xanthon aus *Garcinia mangostana*, hemmt die Cyclooxygenasen 1 und 2, wodurch es zu

einer verringerten Freisetzung von Prostaglandin E₂ in C6-Gliomazellen von Ratten kommt (Nakatani et al., 2002).

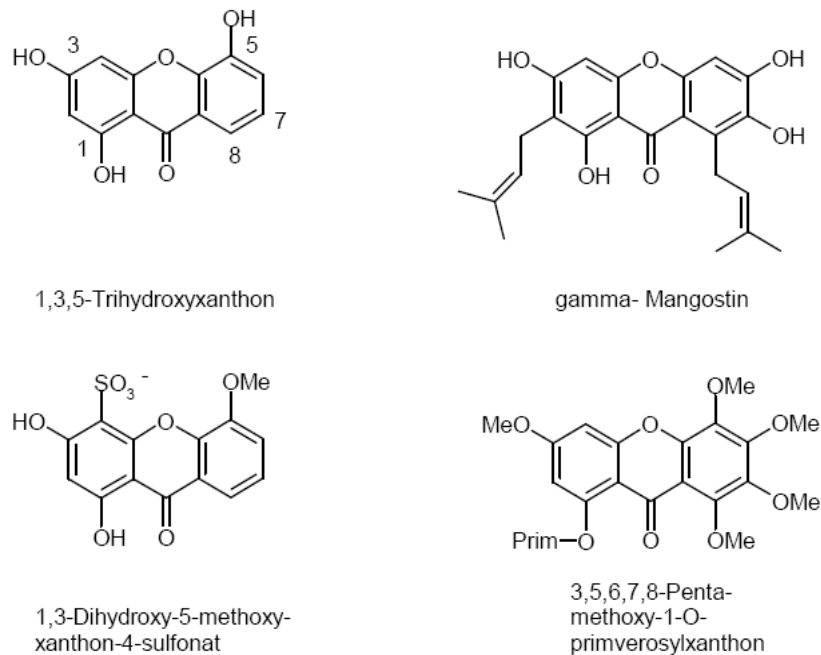


Abb. 1.8: Xanthon-Derivate

1.3.3.3 Flavonoide

Über 4.000 unterschiedliche Flavonoide (Abb. 1.9) sind bekannt (Cook und Samman, 1996). Sie sind Polyphenole und lassen sich aufgrund von Strukturmerkmalen in Gruppen einteilen. Diese sind beispielsweise Flavonole, Flavone, Flavanone, Catechine, Anthocyanidine, Isoflavone, Dihydroflavonole und Chalkone. Neben der Beeinflussung von Enzymen, wie z.B. der Xanthinoxidase (Cos et al., 1998), wurden kardioprotektive (Hertog et al., 1993), antiatherosklerotische (Arai et al., 2000), antithrombotische und vasoprotektive Effekte (Gryglewski et al., 1987) beschrieben. Ebenso wurden antiinflammatorische (Kim et al., 1998), antitumorale (Caltagirone et al., 2000) und antivirale (Wang et al., 1998) Eigenschaften dokumentiert. Wichtige Bedeutung kommt den Flavonoiden als Antioxidantien zu. Dabei können reaktive Sauerstoffspezies über Flavonoide stabilisiert oder auch körpereigene, dem oxidativen Stress entgegen wirkende Enzymsysteme, wie z.B. die Superoxid-Dismutase, unterstützt werden (Nijveldt et al., 2001). Diese antioxidativen Mechanismen sind an vielen der beschriebenen Effekte beteiligt. Auch das bekannte „French Paradox“ wird teilweise über die antioxidative Wirkung von Flavonoiden erklärt (Formica und Regelson, 1995). Einigen Flavonoiden in *H. perforatum* wird antidepressive Wirkung zugeschrieben. Vor allem Rutin (Abb. 1.9) scheint in diesem Zusammenhang Aktivität zu zeigen, wie Noldner und Schotz (2002) berichten.

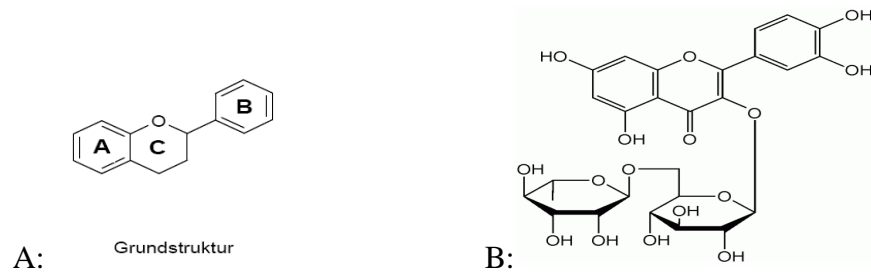


Abb. 1.9: Grundstruktur der Flavonoide (A) und Rutin (B)

1.3.3.4 Hyperforine

Aus neueren Studien geht hervor, dass das polyprenylierte bizyklische Acylphloroglucinderivat Hyperforin (Abb. 1.10), möglicherweise zusammen mit einigen Flavonoiden, hauptsächlich für die Wirksamkeit von Johanniskrautpräparaten verantwortlich ist.

In biochemischen *in vitro*-Testsystemen und im Tiermodell wurde für Hyperforin eine Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme nachgewiesen, woraus eine Erhöhung der Konzentration von Überträgerstoffen im synaptischen Spalt resultiert. Hyperforin verhindert die Wiederaufnahme von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, L-Glutamat, Aspartat und γ -Aminobuttersäure (Chatterjee et al., 2001). Dieses breite Spektrum der Wiederaufnahmehemmung ist bis heute für kein anderes Antidepressivum bekannt (Müller, 1998). Im Gegensatz zu den meisten anderen antidepressiv eingesetzten Pharmaka, die die Wiederaufnahme von Neurotransmittern kompetitiv hemmen, verhindert Hyperforin dies durch Beeinflussung des Natriumgradienten (Müller et al., 1999). *In vitro* wurde der Mechanismus der Hyperforinwirkung aufgeklärt. Hyperforin inhibiert die Serotonin-Wiederaufnahme durch Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration. Dabei wird jedoch die extrazelluläre Konzentration nicht erreicht, was Hyperforin von einem Natrium-Ionophor wie Monensin unterscheidet. Dieser Mechanismus würde die Nicht-Selektivität der Wirkung erklären, da der Transport der Neurotransmitter über Natriumgradient-getriebene Symporter erfolgt. Die Hemmung ist nicht-kompetitiv, wohingegen das synthetische Antidepressivum Citalopram, ein SSRI, die Wiederaufnahme kompetitiv hemmt (Müller et al., 1999). Kürzlich wurde gezeigt, dass Hyperforin spezifisch den TRCP6-Kanal aktiviert. Hyperforin löst einen Natrium- und Calcium-Eintritt in TRPC6-exprimierende Zellen aus (Leuner et al., 2007).

Hyperforin ist aber auch an der Induktion von Cytochrom P40-Enzymen, wie z.B. CYP3A4 und CYP2C9, durch Interaktion mit dem Pregnan X-Rezeptor beteiligt (Moore et al., 2000; Cantoni et al., 2003). Hyperforin weist zudem einen anti-inflammatorischen Effekt auf. Hyperforinhaltige Salben und Cremes werden daher auch zur Behandlung des atopischen Ekzems eingesetzt (Simon et al., 2002). Neben dem antidepressiven Effekt besitzt Hyperforin antibakterielle Wirkung (Gurevich et al., 1971) gegen gram-positive Bakterien und multiresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (Schempp et al., 1999; Reichling et al., 2001). Tab. 1.5 zeigt, welche minimalen inhibitorischen Konzentrationen für Bakterien und Pilze ermittelt wurden. Der Effekt auf gram-positive Bakterien tritt schon bei geringer Hyperforin-Konzentration auf. Die meisten getesteten Pilze und gram-negativen Bakterien wurden jedoch nicht vom Hyperforin beeinträchtigt. Bis jetzt wurde eine Wirksamkeit von *Hypericum*-Extrakten gegen gramnegative Bakterien nur in wenigen Fällen beschrieben (Gudzic et al., 1997). Diese Wirkung erklärt die traditionelle Anwendung von Johanniskraut-Extrakten zur

lokalen Behandlung infizierter Wunden. Die gegenüber Placebo signifikante Wirkung wird den entzündungshemmenden und antibakteriellen Eigenschaften des Hyperforins zugeschrieben.

Tab. 1.5: Antimikrobielle Aktivität von Hyperforin (Reichling et al., 2001)

Organismus	MIC* (µg/ml)
Gram-positive Bakterien	
<i>Staphylococcus aureus</i> (multi-resistent)	0,1
<i>Sarcina lutea</i>	0,1
<i>Bacillus subtilis</i>	0,2
<i>Bacillus mycoides</i>	0,2
<i>Mycobacterium phlei</i>	1,0
<i>Corynebacterium michiganes</i>	1,0
<i>Streptococcus faecalis</i>	1,0
Gram-negative Bakterien	
<i>Escherichia coli</i>	400,0
<i>Proteus vulgaris</i>	400,0
Pilze	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	400,0
<i>Fusarium avenaceum</i>	400,0
<i>Mucor plumbeum</i>	400,0
<i>Candida albicans</i>	400,0

*MIC = minimale inhibitorische Konzentration

Des Weiteren hemmt Hyperforin *in vitro* das Wachstum einiger Tumorzelllinien von Menschen und Ratten durch Induktion der Apoptose. Kürzlich wurde auch die antitumorale Aktivität *in vivo* gezeigt, wobei vielversprechenderweise keine Anzeichen von akuter Toxizität beobachtet wurden (Schempp et al., 2002). In der Dermatologie wird Johanniskrautöl schon lange bei Brandwunden, Myalgien und Kontusionen verwendet. Es gibt bisher nur eine kontrollierte Studie zur Anwendung von Hyperforin-standardisierter Johanniskraut-Creme bei subakuter atopischer Dermatitis (Schempp et al., 2003).

An Maus, Ratte und Mensch wurde die Pharmakokinetik nach oraler Gabe untersucht. Trotz seiner Instabilität ist Hyperforin gut bioverfügbar und nach 2 - 6 Stunden wird der maximale Plasmaspiegel erreicht. Die Halbwertszeit beim Menschen beträgt 15 Stunden, die des Hypericins circa 30 Stunden. Die Blut-Hirn-Schranke wird überwunden (Kerb et al., 1996; Biber et al., 1998).

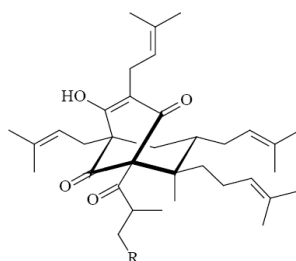


Abb. 1.10: R = H Hyperforin; R = CH₃ Adhyperforin

Hyperforin ist sowohl in frischem als auch getrocknetem Johanniskraut in hohen Konzentrationen enthalten. Die höchsten Hyperforin-Gehalte wurden in Blüten und Früchten gefunden. Damit dient Hyperforin wahrscheinlich dem Schutz der sich entwickelnden Samen vor mikrobiellem Befall und Fressfeinden. In der Blüte akkumuliert es im Stempel (Repák und Mártionfi, 1997) und der Gehalt steigt während der Fruchtreife von 2,5 % auf bis zu 8,5 % an (Tekelová et al., 2000). Im Kraut wurden 2 - 4 % Hyperforin gefunden (Erdelmeier, 1998). Neben Hyperforin wurde in Blüten und Früchten ein zweites Acylphloroglucin, das Adhyperforin (Abb. 1.10), detektiert (Maisenbacher und Kovar, 1992). Blüten enthalten durchschnittlich 0,2 % und Früchte bis zu 2 % Adhyperforin.

1.4 *Hypericum calycinum*

Hypericum calycinum (Abb. 1.11) ist eine andere Pflanzenart aus der Gattung der Johanniskräuter (*Hypericum*) in der Familie der Johanniskrautgewächse (Clusiaceae).



Abb. 1.11: *Hypericum calycinum*

Prenylierte Phloroglucin-Derivate wurden aus *H. calycinum* isoliert und zeigen in *in vitro*-Tests antimykotische, antiplasmodiale und zytotoxische Aktivität (Decosterd et al., 1989; Decosterd et al., 1991).

Alkoholische Extrakte aus intakten Pflanzen von *H. calycinum* hatten im Test mit Mäusen eine ähnliche Wirkung auf das zentrale Nervensystem wie die aus *H. perforatum* gewonnenen Extrakte (Öztürk, 1997).

Zellkulturen von verschiedenen *Hypericum*-Arten wurden auf Hyperforin-Bildung untersucht (Zapletalová, 1999). Dabei zeigte sich, dass nur Kulturen von *H. calycinum* Hyperforine, vor allem das Adhyperforin, enthalten. Sie stellen daher, neben intakten Pflanzen von *H. perforatum*, ein gutes *in vitro*-System für die Untersuchung der Biosynthese von Hyperforinen dar. Zudem gab es biochemische Hinweise, dass das Grundgerüst der Hyperforine von einer Typ III-Polyketid-Synthase gebildet wird (Zapletalová, 1999).

1.5 Biosynthese der Hyperforine

Die Biosynthese des Hyperforins kann in zwei Abschnitte gegliedert werden: erstens die Bildung des Grundgerüsts und nachfolgend die Prenylierungsreaktionen. Der vorgeschlagene Biosyntheseweg ist in Abb. 1.12 dargestellt.

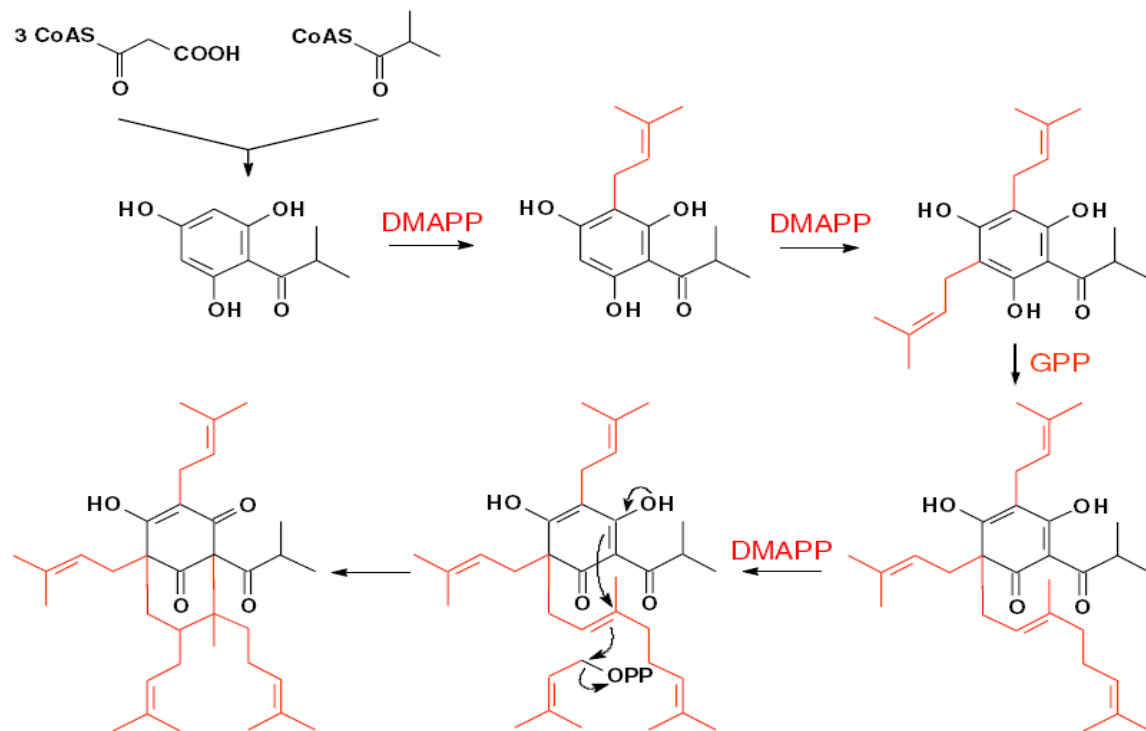


Abb. 1.12: Vorgeschlagener Hyperforin-Biosyntheseweg (Beerhues, 2006)

Die Bildung des Hyperforin-Grundgerüsts wird von einer Typ III-Polyketid-Synthase, der Isobutyrophenon-Synthase (BUS), katalysiert (Klingauf et al., 2005). Bei der Reaktion kondensieren drei Moleküle Malonyl-CoA mit einem Molekül Isobutyryl-CoA. Das lineare Intermediat wird im selben aktiven Zentrum durch intramolekulare Claisen-Kondensation zum Phlorisobutyrophenon zyklisiert (Abb. 1.13). Diese Reaktion wurde in Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen. Im Falle des Adhyperforins wird 2-Methylbutyryl-CoA als Starter-Einheit verwendet.

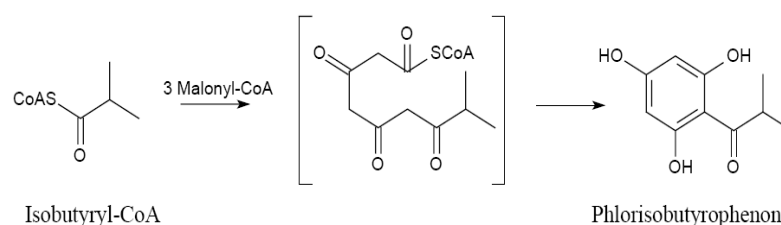


Abb. 1.13: Reaktion der Isobutyrophenon-Synthase (BUS)

Das Hyperforin-Skelett wird unter Katalyse von Prenyltransferasen mehrfach prenyliert. Die letzte C-Alkylierung geht mit einer Zyklisierung zum bizyklischen Hyperforin einher (Abb. 1.12).

Als Prenyldonor der ersten Prenylierung fungiert Dimethylallylpyrophosphat (Abb. 1.14). Dieser erste Prenylierungsschritt wurde ebenfalls in Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen (Boubakir et al., 2005). Er wird von einer löslichen und Fe^{2+} -abhängigen Prenyltransferase katalysiert.

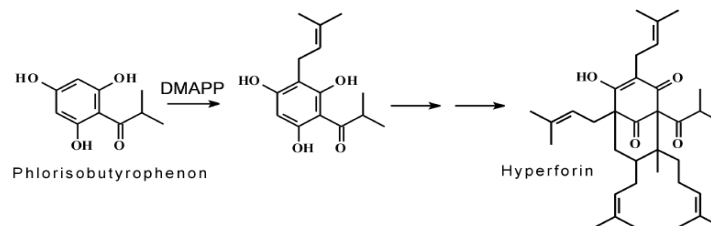


Abb. 1.14: Der erste Prenylierungsschritt in der Hyperforin-Biosynthese mit DMAPP als Prenyldonor (Boubakir et al., 2005)

1.6 Polyketide und Polyketid-Synthasen

1.6.1 Polyketide

Zahlreiche Polyketide sind von hoher Bedeutung als Arzneistoffe. Polyketide werden z.B. als Antibiotika, Immunsuppressiva, Antineoplastika oder Antimykotika eingesetzt. Als Polyketide bezeichnet man eine große Gruppe von Sekundärstoffen, die bezüglich ihrer chemischen Strukturen und pharmakologischen Eigenschaften äußerst heterogen sind. Der Mechanismus ihrer Biosynthese ist allerdings ähnlich, nämlich eine Verknüpfung von Acetyl-Einheiten zu Poly- β -keto-Verbindungen (Schröder, 1997). Die katalysierenden Enzyme, die Polyketid-Synthasen, bilden aus einfachen Coenzym A-aktivierten Acyl-Gruppen, z.B. Acetyl-CoA und Malonyl-CoA, Polyketide. Je nach Anzahl der in die Synthese eingebundenen Acyl-CoAs kann man von Di-, Tri-, Tetraketiden u.s.w. sprechen (Abb. 1.15).

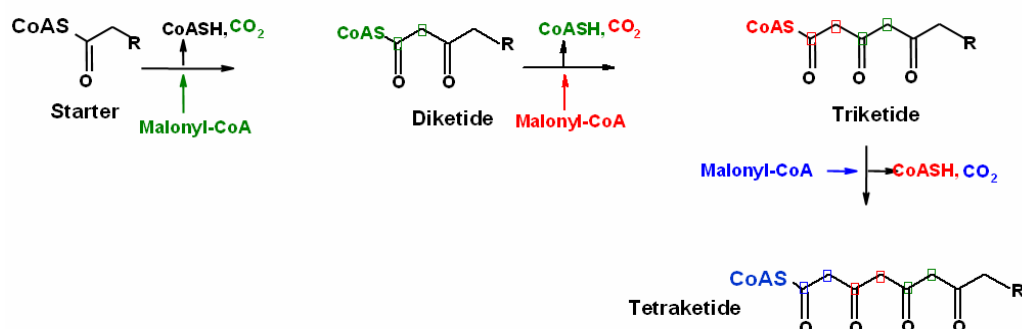


Abb. 1.15: Tetraketid-Biosynthese

Diese schrittweise Kettenverlängerung ähnelt der Fettsäurebiosynthese. Im Gegensatz zu dieser findet jedoch eher selten eine Reduktion zu einer aliphatischen Kette statt. Jeder Acetyl-Baustein der Kette kann auf verschiedenen Stufen der Modifizierungen zur Fettsäure stehen bleiben (Ketogruppe → Hydroxylgruppe → Doppelbindung → Einfachbindung). Weitere Enzymreaktionen (z.B. Zyklisierung, Methylierung oder Oxygenierung) vervollständigen die Biosynthese der Polyketide (Abb. 1 16).

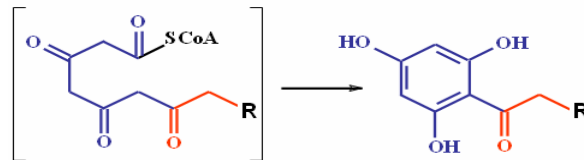


Abb. 1 16: Zyklisierung eines Tetraketids (Claisenkonensation: C-6→C-1-Verknüpfung)

Die Vielfalt der pflanzlichen Polyketide (Tab. 1.6) wird vor allem durch vier Mechanismen erreicht (unterschiedliche Starter-Moleküle, Addition einer unterschiedlichen Zahl von Acetyl-Einheiten, unterschiedliche Auffaltung und intramolekulare Zyklisierung des linearen Polyketids, Addition weiterer Substituenten).

Tab. 1.6: Beispiele für Polyketide (die Startersubstrate liegen als CoA-Ester, die Acetyl-Einheiten als Malonyl-CoA vor)

Starter	Acetyl-Einheiten	Produkte (oft weiter modifiziert)
Acetat	3	Orsellinsäure, Phloracetophenon u.a.
Acetat	7	1,8-Dihydroxyanthron; Hypericin
3-Methylbuttersäure	3	Acylphloroglucine (Hopfenbittersäuren)
2-Methylpropionsäure und 2-Methylbuttersäure	3	Hyperforine (<i>Hypericum</i>)
Hexansäure	3	Tetrahydrocannabinol (<i>Cannabis</i>)
Zimtsäure	2	Styrylpyrone (z.B. Kavapyrone)
Zimtsäure	3	Stilbene, Flavonoide, Aurone
Benzoessäure	3	Xanthone

1.6.2 Polyketid-Synthasen

An der Bildung der Hyperforine ist eine Polyketid-Synthase beteiligt (Zapletalová, 1999). Außer für die Hyperforine sind Polyketid-Synthasen in Pilzen, Bakterien und Pflanzen für die Bildung vieler Sekundärmetabolite mit pharmakologischen Eigenschaften verantwortlich. Hierunter sind, wie erwähnt, Antibiotika, Immunsuppressiva und Antimykotika. Die Polyketid-Synthasen zählen zu den Acyltransferasen (EC 2.3.) und zeichnen sich durch den Transfer von Acetyleinheiten auf unterschiedlichste Startereinheiten aus. Zu den derzeit ca. 170 Acyltransferasen, die keine Aminogruppen übertragen (EC 2.3.1), zählen auch die Fettsäuresynthasen (Brand, 2005). Die auch als PKS bezeichneten Enzyme werden in drei große Gruppen aufgeteilt: PKS I, PKS II und PKS III. Die Typen I und II kommen in Mikroorganismen vor, Typ III in Pflanzen und Bakterien. Alle drei Typen leiten sich wahrscheinlich evolutiv von der β -Ketoacylsynthase aus der Fettsäure-Biosynthese ab (Austin und Noel, 2002) und katalysieren Reaktionen mit ähnlichen Mechanismen. Dabei sind die Substrate entweder mit Coenzym A oder dem etwa 9 kDa großen Acylcarrierprotein verestert.

1.6.2.1 Polyketid-Synthasen I

Bei den Typ I-PKS handelt es sich um multifunktionale Enzymkomplexe aus mehreren Polypeptiden mit einer Größe von bis zu 350 kDa (Pieper et al.; 1995). Jede einzelne Domäne des Komplexes ist für einen eigenen katalytischen Prozess, meist eine C-C Verknüpfung und modifizierende Reaktionen, verantwortlich. Der bekannteste Vertreter der PKS I-Gruppe ist die Erythromycin-Synthase des Bakteriums *Saccharopolyspora erythraea*, die aus drei gigantischen multifunktionalen Polypeptiden (jeweils etwa 350 kDa) besteht. Dieses Enzym benutzt als Startersubstrat Propionyl-CoA und als Kettenverlängerer sechs Methylmalonyl-CoA. Außerdem benötigt es NADPH.

1.6.2.2 Polyketid-Synthasen II

Die Typ II-PKS sind ebenfalls multifunktionelle Proteinkomplexe, die die Bildung von cyclischen und aromatischen Produkten katalysieren, allerdings fehlt ihnen die Fähigkeit zur Reduktion. Häufigste Produktgruppe sind phenolische Verbindungen. Im Gegensatz zu Typ I sind die Multienzymkomplexe vom Typ II dissoziiierbar und nicht immer zusammenhängend im Genom kodiert. Eine PKS II katalysiert z.B. die bakterielle Synthese von Resistomycin in *Streptomyces resistomycificus*. Der Enzymkomplex kondensiert ein Malonyl-CoA (Starter) mit neun weiteren Malonyl-Resten (Verlängerer) und führt anschließend eine spezifische Zyklisierung zum Resistomycin durch. Sowohl Typ I als auch Typ II PKS benötigen ein Acylcarrierprotein zum Transport der sich bildenden Produktkette von einer Enzymfunktion zur nächsten.

1.6.2.3 Polyketid-Synthasen III

Pflanzliche Polyketid-Synthasen (Typ III) unterscheiden sich stark von PKS der Typen I und II. Typ III-PKS sind Homodimere mit einer Proteingröße von ca. 80 - 85 kDa (Schröder, 1999). Sie besitzen pro Untereinheit ein aktives Zentrum und haben die Fähigkeit, hier alle Schritte der Biosynthese von Sekundärstoffen wie z.B. Decarboxylierung, Kondensation, Cyclisierung und Aromatisierung zu katalysieren. Funktionell unterscheiden sie sich von den anderen Klassen durch die direkte Kondensation von Malonyl-CoA mit dem jeweiligen Startersubstrat oder intermediären Polyketid. Eine Übertragung durch ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) findet hier nicht statt. Neben der Kettenverlängerung durch PKS III katalysieren diese Proteine auch häufig anschließende Zyklisierungsreaktionen. Die PKS III unterscheiden sich in der Präferenz des an Coenzym A gebundenen Startermoleküls, der Zahl der Additionen von Acetyleinheiten und der Art der katalysierten Zyklisierung. Evolutiv leiten auch sie sich von der β -Ketoacyl-Synthase der Fettsäure-Biosynthese ab.

Der bekannteste Vertreter der PKS III ist die Chalkon-Synthase (CHS) (Abb. 1.17), welche als Schlüsselenzym der Flavonoid-Biosynthese ubiquitär im Pflanzenreich auftritt (Heller et al., 1994). Von ihr leiten sich weitere angepasste Polyketid-Synthasen mit diversen Substrat- und Produktspezifitäten ab. Als Synonym für die funktionell diversen Typ III-PKS wird auch der Begriff der CHS-verwandten Enzyme genutzt, da sie durch Duplizierung eines gemeinsamen Vorläufergens und Mutation der Genkopie hervorgegangen sind. Die funktionell verschiedenen pflanzlichen PKS III weisen auf der Aminosäuresequenz-Ebene

40 - 80 % Homologie zu den CHS auf. Aus der kürzlich aufgeklärten Kristallstruktur einer CHS weiß man, dass drei Aminosäuren (Cys 164, His 303 und Asn 336) im katalytischen Zentrum essenziell sind und auch in anderen CHS-verwandten Enzymen hoch konserviert vorliegen (Ferrer et al., 1999). Demzufolge sind sie als sogenannte katalytische Triade in allen Polyketid-Synthasen des Typs III mechanistisch bedeutsam (Austin und Noel, 2003).

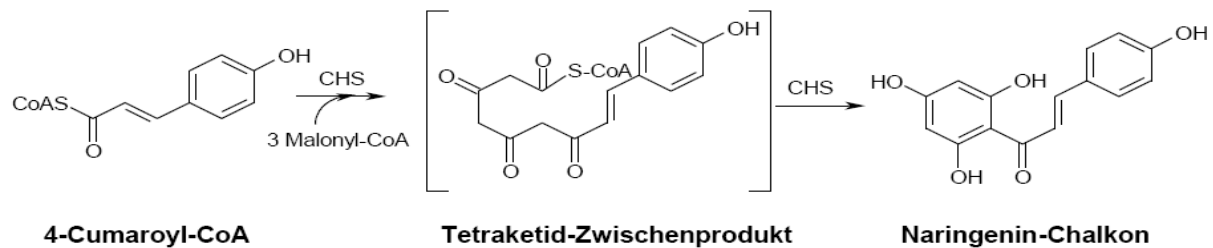


Abb. 1.17: Reaktion der Chalkon-Synthese (CHS)

1.6.3 Beispiele für Typ III-Polyketid-Synthasen

1.6.3.1 Chalkon-Synthese (CHS) und Stilben-Synthese (STS)

Die Chalkon-Synthase ist der Prototyp aller Typ III-PKS und mit ihr wurden die meisten Untersuchungen durchgeführt. Sie katalysiert die Synthese des C₁₅-Grundgerüsts der Flavonoide, einer Gruppe von Sekundärstoffen, die ubiquitär in den Pflanzen vorkommen. Flavonoide erfüllen wichtige Aufgaben wie Pigmentierung und UV-Schutz, dienen als Phytoalexine und Signalmoleküle bei der Interaktion mit Rhizobien und können essentiell für die Pollenfertilität sein (Shirley et al., 1996; Martin et al., 1993). Als Effekte auf die menschliche Gesundheit können Flavonoide antiviral, antiplasmodial, antimikrobiell und auch antitumoral wirken (Zhang et al., 2004; Iinuma et al., 1996). Als Startersubstrat der CHS dient *p*-Cumaroyl-CoA, welches mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem Tetraketid kondensiert wird, das anschließend durch Ringbildung zwischen C-1 und C-6 zum Naringenin-Chalkon zyklisiert (Abb. 1.17).

Die Stilben-Synthase (STS) nutzt denselben Starter wie Chalcon-Synthasen und führt ebenfalls drei Kondensationen mit Malonyl-CoA durch. Allerdings wird das entstehende Tetraketid in anderer Weise zyklisiert. Die Ringbildung erfolgt zwischen C-2 und C-7. Außerdem wird das entstandene Intermediat decarboxyliert (Abb. 1.18). Kloniert wurde Stilben-Synthase aus *Pinus sylvestris* (Schröder et al., 1988). Die Funktion der Stilbene, z.B. Resveratrol, liegt in der Pathogenabwehr. Sie werden bei Pathogenbefall und Verletzung induziert und sind daher als Phytoalexine zu betrachten. Es wird angenommen, dass das Resveratrol für das „Französische Paradoxon“ verantwortlich ist, nämlich die antiatherosklerotische Wirksamkeit verschiedener Rotweine (Sielmann und Creasy, 1992).

Aus der Sequenzanalyse heraus ist es nicht möglich, Chalkon-Synthasen und Stilben-Synthasen zu unterscheiden. Die einzelnen Stilben-Synthasen einer Pflanzengattung zeigen große Ähnlichkeit untereinander und sind den Chalkon-Synthasen derselben Gattung ähnlicher als den Stilben-Synthasen anderer Gattungen. Daher wurde angenommen, dass sich Stilben-Synthasen in der Evolution mehrfach aus Chalkon-Synthasen entwickelt haben (Tropf et al., 1994).

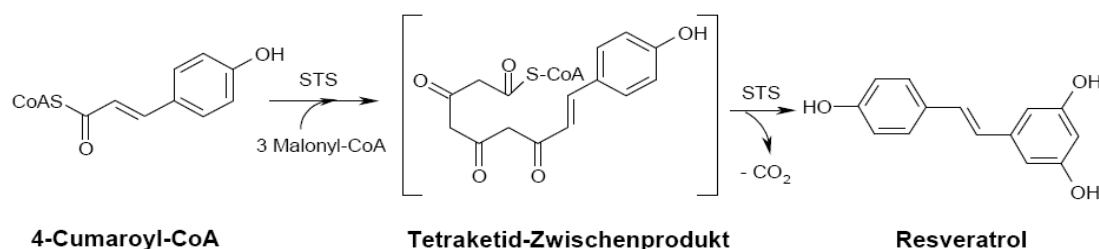


Abb. 1.18: Reaktion der Stilben-Synthase (STS)

1.6.3.2 Benzophenon-Synthase (BPS) und Biphenyl-Synthase (BIS)

Die Benzophenon-Synthase (BPS) und die Biphenyl-Synthase (BIS) katalysieren die Bildung des selben intermediären Tetraketids ausgehend von der Kondensation von einem Molekül Benzoyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA (Liu et al., 2003; 2004). Anschließend unterstützen sie aber unterschiedliche Zyklisierungsmechanismen. Bei der BPS-katalysierten Reaktion kommt es durch eine Claisenkondensation zu einer C-6→C-1-Verknüpfung (Abb. 1.20). Die BIS (Abb. 1.19) katalysiert hingegen eine C-2→C-7-Verknüpfung über eine Aldolkondensation (Liu et al., 2007). Somit stellen BPS und BIS die zentralen Elemente der Biosynthese der Benzophenone und Xanthone bzw. der Biphenyle dar. Die Biphenyl-Synthase unterscheidet sich also von der Benzophenon-Synthase dadurch, dass sie eine Decarboxylierung und eine Stilben-Synthase-ähnliche Zyklisierung durchführt.

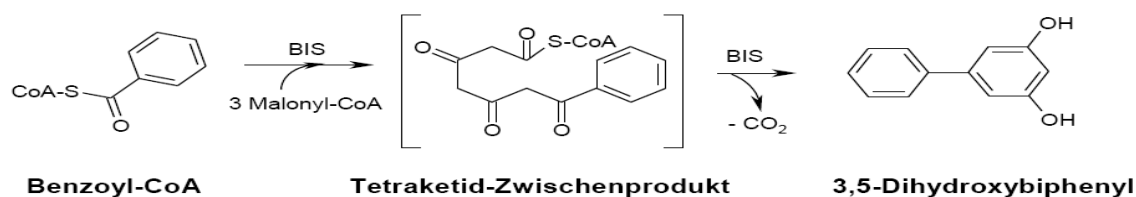


Abb. 1.19: Von Biphenyl-Synthase (BIS) katalysierte PKS III Reaktion

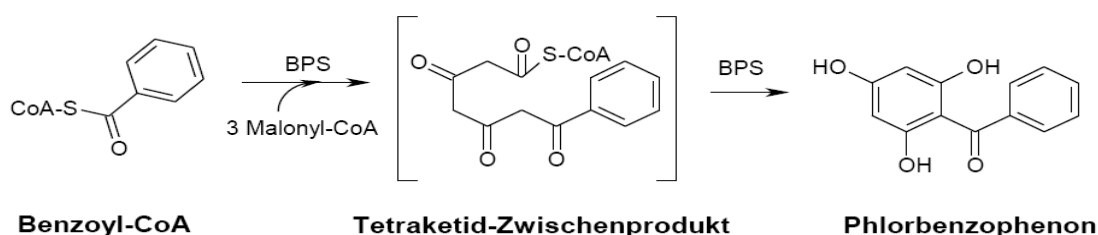


Abb. 1.20: Von Benzophenon-Synthase (BPS) katalysierte PKS III Reaktion

Die BPS-cDNA aus *H. androsaemum* wurde von Liu et al. (2003) kloniert und charakterisiert. Heterolog exprimierte BPS ist ein Homodimer aus 42,8 kDa großen Untereinheiten. Sie katalysiert die Bildung des Grundgerüsts der Benzophenon-Derivate, zu denen polyprenylierte Verbindungen und Xanthone zählen (Liu et al., 2003; Beerhues und Berger, 1995; Schmidt et al., 2000). Die Biphenyl-Synthase wurde zum ersten Mal in *Sorbus aucuparia*-Zellkulturen entdeckt (Liu et al., 2004). Bekannte Biphenyl-Derivate sind zum

Beispiel das Aucuparin in *Sorbus aucuparia* (Eberesche) sowie das Malusfuran in *Malus domestica* (Apfel). Beide Stoffe sind bedeutende Phytoalexine wirtschaftlich wichtiger Obstbäume und somit interessante Forschungssubstanzen (Kokubun und Harborne, 1994; Kokubun und Harborne, 1995).

1.6.3.3 Valerophenon-Synthase (VPS)

Die Valerophenon-Synthase, genauer Phlorisovalerophenon-Synthase, ist ein Enzym, welches zum ersten Mal in Hopfen (*Humulus lupulus*) detektiert wurde (Zuurbier et al., 1998). Als bevorzugtes Substrat akzeptiert sie das Isovaleryl-CoA. Dieses wird mit drei Malonyl-CoA zu einem Tetraketidzwischenprodukt verknüpft. Nach einer Claisen Kondensation entsteht Phlorisovalerophenon (Abb. 1.21). Aus diesem entstehen im Hopfen unter anderem die Hopfenbitterstoffe, zu denen Humulon und Lupulon zählen.

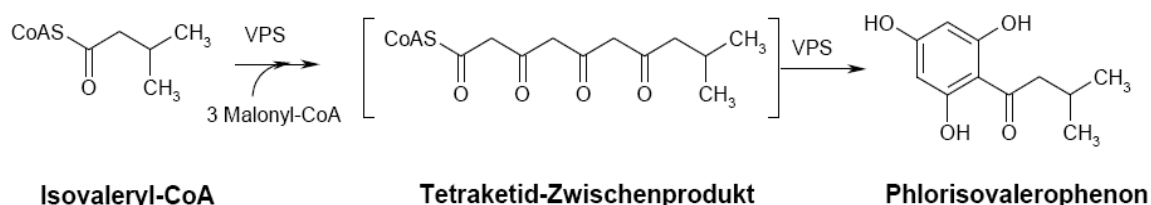


Abb. 1.21: Durch Valerophenon-Synthase (VPS) katalysierte PKS III Reaktion

1.6.3.4 Isobutyrophenon-Synthase (BUS)

Eine weitere PKS Typ III ist die neben der CHS und der BPS in *H. perforatum* vorkommende Isobutyrophenon-Synthase (BUS). Für Forschungszwecke gibt es noch keine klonierte cDNA, aber das Enzym wurde einwandfrei in Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen (Klingauf, 2004; Klingauf et al., 2005). BUS bildet das Grundgerüst des in *H. perforatum* wichtigen Inhaltsstoffs Hyperforin, dessen antidepressive Wirksamkeit belegt ist (Schulz, 2003). BUS katalysiert die Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA mit einem Molekül Isobutyryl-CoA zu einem linearen Tetraketid. Anschließend erfolgt eine Zyklisierung über eine Claisen Kondensation sowie eine Aromatisierung zum Endprodukt Phlorisobutyrophenon (Abb. 1.22).

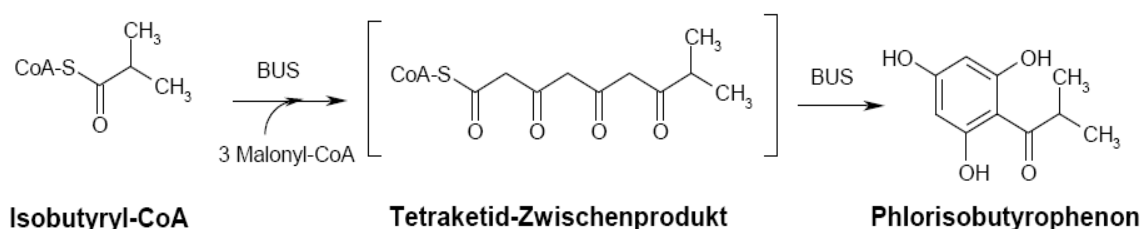


Abb. 1.22: Von Isobutyrophenon-Synthase (BUS) katalysierte PKS III Reaktion

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Drei Typ III-PKS wurden in *H. perforatum* und *H. calycinum* auf der biochemischen Ebene nachgewiesen: CHS, BPS und BUS (Klingauf et al., 2005). Für CHS und BPS wurden aus beiden Spezies cDNAs kloniert und die rekombinanten Enzyme heterolog exprimiert und charakterisiert (Klingauf, 2004). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung der cDNA für Isobutyrophenon-Synthase (BUS). Als mRNA-Quellen dienten Adhyperforin-produzierende Zellkulturen von *H. calycinum* sowie intakte Pflanzen von *H. calycinum* und *H. perforatum*.

Die einzelnen Schwerpunkte der Arbeit können daher wie folgt definiert werden:

1. Isolierung von RNA und genomischer DNA aus den gewählten Pflanzen.
2. Amplifikation von Sequenzen, die Ähnlichkeit mit Typ III-Polyketid-Synthasen haben.
3. Heterologe Expression der durch diese Sequenzen kodierten Proteine.
4. Charakterisierung der Enzyme und Analyse der Ergebnisse im Hinblick auf eine Beteiligung der isolierten Enzyme an der Biosynthese der Hyperforine.

2. Material

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Intakte Pflanzen

Pflanzen von *Hypericum calycinum* (Abb. 2.1) und *Hypericum perforatum* (Abb. 2.2) wurden im Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig geerntet.



Abb. 2.1: *Hypericum calycinum*



Abb. 2.2: *Hypericum perforatum*

2.1.2 Pflanzengewebekulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Kalluskulturen (Abb. 2.3) standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.



Abb. 2.3: Kalluskultur von *H. calycinum* auf LS-Medium

Zellsuspensionskulturen wurden selbst angelegt und auf zwei verschiedenen Medien kultiviert (Abb. 2.4 und 2.5).



Abb. 2.4: Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* in LS-Medium



Abb. 2.5: Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* in BDS-Medium

2.1.2.1 Anlegen einer Zellsuspensionskultur

Ungefähr 1 g Zellen einer Kalluskultur wurden unter sterilen Bedingungen in 50 ml Flüssigmedium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben transferiert.

2.1.2.2 Kultivierung von Kallus- und Zellsuspensionskulturen

Die Kulturen auf Festmedien wurden unter Dauerlicht auf LS-Medium (Linsmaier und Skoog, 1965) kultiviert. Alle drei Wochen wurde ein Teil der Zellmasse unter sterilen Bedingungen auf frisches Festmedium transferiert. Alle Zellsuspensionen wurden auf einem Schüttler (180 rpm) bei konstanter Temperatur von 25 °C und im Dunkeln steril kultiviert. Falls keine definierte Einwaage nötig war, wurden die Zellkulturen im Abstand von 7 Tagen durch einfaches Verteilen eines Kolbeninhalts auf zwei neue Kolben mit je 50 ml frischem Flüssigmedium weiterkultiviert. Diese Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer**2.2.1 Chemikalien, biochemische und molekularbiologische Reagenzien**

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid	Gibco-BRL
Agar-Agar	Roth
Agarose	peolab, NEEO Ultra Roth
Ampicillin	Fluka, Roth
Bacto-tryptone	Roth, Life Technologies
Bacto-yeast extract	Roth, Life Technologies
Bis-Acrylamid	Gibco-BRL
Chloroform (HPLC Grade)	Fisher Scientific
D-Glukose	Fluka
DMSO	Fluka
Ethidium Bromide	Roth
Formamid	Sigma Aldrich, Roth
IPTG	Sigma Aldrich
Laoding dye	Fermentas
MnCl ₂	Fermentas
NaCl	Roth
SDS	Roth
Stickstoff	lindl
TEMED	Bio-Rad
X-Gal	Sigma Aldrich
Alle anderen Chemikalien: p.A. oder HPLC Qualität	

2.2.2 Nährmedien für Pflanzengewebekulturen

Alle Medienbestandteile wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Mit Alufolie verschlossene Kolben mit 50 ml Medium wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Medium	Zusammensetzung	Herstellung des Mediums und Verwendung
BDS-Flüssigmedium (modifiziertes B5 Medium; Gamborg et al, 1968; Dunstan und Short, 1977)	I	Stammlösungen mit 800 ml Wasser vereinigen. Saccharose darin lösen und pH auf 5,5 einstellen. Mit Wasser auf einen Liter auffüllen. Autoklavieren. Nährmedium für Zellsuspensionskulturen
	CaCl ₂ x2H ₂ O	
	150 mg/l	
	KNO ₃	
	2530 mg/l	
	NH ₄ NO ₃	
	320 mg/l	
	NH ₄ H ₂ PO ₄	
	230 mg/l	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	134 mg/l	
	MgSO ₄ x7H ₂ O	
	247 mg/l	
	MnSO ₄ x4H ₂ O	
	13,2 mg/l	
	ZnSO ₄ x7H ₂ O	
	2,0 mg/l	
	II	
	CuSO ₄ x5H ₂ O	
	0,039 mg/l	
	KI	
	0,75 mg/l	
	CoCl ₂ x6H ₂ O	
	0,025 mg/l	
	Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	
	0,25 mg/l	
	H ₃ BO ₃	
	3,0 mg/l	
	NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	
	172 mg/l	
	III	
	FeSO ₄	
	27,85 mg/l	
	TitriplexIII (Na ₂ EDTAx2H ₂ O)	
	37,25 mg/l	
	IV	
	Nicotinsäure	
	1,0 mg/l	
	Thiaminiumdichlorid	
	10,0 mg/l	
	Pyridoxolhydrochlorid	
	1,0 mg/l	
	myo-Inosit	
	100,0 mg/l	
	V	
	Kinetin (6-Furfurylaminopurin)	
	100 mg/l	
	Dicamba	
	7,5 mg/l	
	(3,6-Dichloro-2-methoxybezoessäure)	
	VI	
	Saccharose	
	30 g/l	

Medium	Zusammensetzung	Herstellung des Mediums und Verwendung
LS-Flüssigmedium (Linsmeier und Skoog, 1965)	<p>I</p> <p>KNO₃ 1900 mg/l</p> <p>NH₄NO₃ 1650 mg/l</p> <p>CaCl₂x2H₂O 40 mg/l</p> <p>MgSO₄x7H₂O 70 mg/l</p> <p>KH₂PO₄ 170 mg/l</p> <p>II</p> <p>MnSO₄xH₂O 16,90 mg/l</p> <p>ZnSO₄x7H₂O 0,60 mg/l</p> <p>KI 0,83 mg/l</p> <p>H₃BO₃ 6,20 mg/l</p> <p>Na₂MoO₄ 0,25 mg/l</p> <p>FeSO₄x7H₂O 27,80 mg/l</p> <p>CuSO₄x5H₂O 0,025 mg/l</p> <p>CoCl₂x6H₂O 0,025 mg/l</p> <p>III</p> <p>Titriplex III (Na₂ EDTAx2H₂O) 41,30 mg/l</p> <p>IV</p> <p>myo – Inosit 100,0 mg/l</p> <p>Thiaminiumchlorid 0,4 mg/l</p> <p>V</p> <p>2,4-Dichlorphenoxy-Essigsäure 0,90 µM</p> <p>1-Naphtylessigsäure 1,04 µM</p> <p>VI</p> <p>Saccharose 30,0 g/l</p>	<p>Stammlösungen mit 800 ml Wasser vereinigen.</p> <p>Saccharose darin lösen und mit Wasser auf einen Liter auffüllen.</p> <p>pH von 6,0 bis 6,3 mit konzentrierter NaOH einstellen.</p> <p>Autoklavieren.</p> <p>Nährmedium für Zellsuspensionskulturen</p>
LS-Festmedium	siehe LS-Medium, aber mit Zusatz von 8,0 g/l SELECT Agar unter Erwärmung des Mediums auf ca. 80 °C	Kulturmedium für Pflanzenkalli.

2.2.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie

2.2.3.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium (Sambrook und MacCallum, 2001)	Bacto-pepton	10 g	pH auf 7,0-7,2 einstellen, autoklavieren
	Hefeextrakt	5 g	
	NaCl	10 g	
	Bidest. Wasser	ad 1000 ml	
LB-Festmedium	Den Festmedien wurde vor der Sterilisation 15 g/l Agar zugesetzt.		
SOC Medium	Bacto-pepton	2 g	
	Hefeextrakt	0,5 g	
	1 M NaCl	1 ml	
	1 M KCl	0,25 ml	
	in 97 ml bidest. Wasser lösen, autoklavieren und abkühlen lassen; dann zugeben:		
	2 M Mg ⁺ Stammlsg.	1 ml	
	2 M Glukose	1 ml	
	Bidest. Wasser	ad 100 ml	
	Bei -20 °C lagern		
2 M Mg²⁺ Stammlsg.	MgCl ₂ x6H ₂ O	20,33 g	Sterilfiltrieren
	MgSO ₄ x7H ₂ O	24,65 g	
	Bidest. Wasser	ad 100 ml	

2.2.3.2 Lösungen für die Transformation und Selektion von *E. coli*

0,5 M IPTG Lösung	IPTG	6 g	Sterilfiltrieren und bei - 20 °C lagern
	Bidest. Wasser	ad 500 ml	
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid	100 mg	In Aluminiumfolie einpacken und bei - 20 °C lagern
	N,N'-Dimethylformamid	2 ml	

Antibiotika

Ampicillin	Ampicillin	100 mg	Sterilfiltrieren, bei - 20 °C lagern
	Bidest. Wasser	ad 1 ml	
Chloramphenicol	Chloramphenicol	30 mg	bei - 20 °C lagern
	Ethanol 100 %	ad 1 ml	

2.2.3.3 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

50x TAE	Tris EDTA	2 M 0,05 M	mit Eisessig auf pH 8 einstellen
TBE-Puffer (für Sequenziergele)	Tris Borsäure EDTA	90 mM 90 mM 2 mM	
Ladepuffer (zum Sequenzieren)	25 mM EDTA Formamid Dextranblau	1 ml 5 ml 0,1 mg	Formamid mit Harz trocknen
Sequenziergel	Harnstoff 10x TBE Puffer Bidest. Wasser 30 % Acrylamid TEMED 10 % (w/v) APS	9 g 3,0 ml 11,5 ml 3,75 ml 0,01 ml 230 µl	

2.2.3.4 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Puffer P1	Tris-HCl EDTA RNase A	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl und EDTA Lösungen sterilfiltrieren, mischen, pH auf 8,0 einstellen, RNase A vor Gebrauch frisch zugeben
Puffer P2	NaOH SDS	0,2 M 1 % (w/v)	Autoklavieren
Puffer P3	Kaliumacetat	2,55 M	pH auf 4,8 einstellen, autoklavieren
Natriumacetat Lösung (pH 5)	Natriumacetat	3 M	pH auf 4 einstellen
TE-Puffer	Tris-HCl EDTA	10 mM 1 mM	für genomische DNA auf pH 8,0 einstellen; für Plasmid auf pH 7,6

2.3 Enzyme

DNA-Synthese	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fa. Fermentas
	Omnitac-OLS [®] -DNA-Polymerase	OLS [®] Omni Life Science
	Dream <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fa. Fermentas
	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Fa. Fermentas
	PowerScript	Fa. Clontech
	Superskript II	Fa. Invitrogen Life Technologies
	Superscript III	Fa. Invitrogen Life Technologies
	Thermoscript	Fa. Sigma, MBI-Biotech
	M-MuLV -Reverse Transkriptase	Fa. Fermentas
	RevertAid [™] H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	Fa. Fermentas
	Primescript	Fa. Invitrogen Life Technologies
	PrimeScript [™] Reverse Transcriptase	Fa. TAKARA BIO INC.
Restriktion	<i>Eco</i> RI, <i>Kpn</i> I, <i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RV	Fa. Fermentas
Weitere Enzyme	T4-Ligase	Fa. Fermentas
	DNase	Fa. Fermentas
	RNase A	Fa. Fermentas
	RNase H	Fa. Fermentas
	RNase T	Fa. Fermentas
	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	Fa. Fermentas
	RiboLock RNase Inhibitor	Fa. Fermentas

2.4 Kits

RNA-Isolierung	QuickPrep [®] micro mRNA Purification Kit	Fa. Amersham Biosciences
	RNeasy [®] Plant Mini Kit	Fa. Qiagen
	NucleoSpin RNA Plant Kit	Fa. Macherey-Nagel
	MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit	Fa. Epicenter [®] Biotechnologies
DNA-Isolierung und Reinigung	Mini Elute Gel Extraktion Kit	Fa. Qiagen
	Nucleospin [®]	
	MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit	Fa. Epicenter [®] Biotechnologies
	Dneasy Plant Mini kit [®]	Fa. Qiagen
	DNA Purification Kit	
	Omnipure-OLS [®] (DNA-Gelextraktion und Aufreinigung von PCR Produkt)	Macherey&Nagel
		OLS [®] Omni Life Science
Sequenzierung	BigDye ^R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Appl. Biosystems

2.5 Bakterienstämme und Vektoren

2.5.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i>	relevante Eigenschaften
K12[®] DH 5α	$F' \phi 80 \delta lacZ \Delta M15 \text{ end } A1 \text{ hsd}R17(rk^- mk^+) supE44 thi-1$ $\lambda \text{ gyrA96 relA1 } \Delta(lacZYA-argFV169) deoR$
BL 21	F^- , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r_B^- , m_B^-), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pLysS (Cam ^R)

2.5.2 Vektoren

Plasmid	Quelle	Eigenschaften
p-GEM-T easy	Promega Invitrogen	3 kb T-Überhangvektor, <i>lacZ</i> , Ampicillinresistenz
p-GEM-T easy	selbst erstellt	3 kb T-Überhangvektor, <i>lacZ</i> , Ampicillinresistenz
pRSET B	Promega Invitrogen	2,9 kb Expressionsvektor, N-terminal 6xHIS zur Proteinreinigung, Ampicillinresistenz

2.6 Nukleotide

dNTP	dATP	100 mM	Fa. Fermentas
	dCTP	100 mM	Fa. Fermentas
	dGTP	100 mM	Fa. Fermentas
	dTTP	100 mM	Fa. Fermentas
Nukleotide	Längenstandards 100 bp DNA-Leiter		Fa. Fermentas
	Gene Ruler DNA-Ladder Mix		Fa. Fermentas

2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) im Auftrag synthetisiert bezogen. Die lyophilisierten, salzfreien Oligonukleotide wurden in HPLC -Wasser gelöst. Die Endkonzentration betrug 100 pmol/μl.

2.7.1 SMART-RACE Primer

SMART II	5'-aag cag tgg taa caa cgc aga gta cgc ggg-3'
5'-CDS	5'-(t) ₂₅ N ₋₁ N-3'
3'-CDS	5'-aag cag tgg taa caa cgc aga gta c(t) ₃₀ N ₋₁ N-3'
RACE-short	5'-cta ata cga ctc act ata ggg c-3'
RACE-long	5'-cta ata cga ctc act ata ggg caa gca gtg gta aca acg cag agt-3'
RACE-nested	5'-aag cag tgg taa caa cgc aga gt-3'
AAP	5'-ggc cac gcg tcg agt acg ggi igg gii ggg iig-3'
AUAP	5'-ggc cac gcg tcg act agt ac-3'

i: Inosine

Die 3'CDS und 5'CDS Primer besitzen zwei variable Basen (N₋₁ N). Dadurch können sie spezifischer mit dem Anfang des Poly(A)-Restes der mRNA hybridisieren (Liang et al., 1993).

2.7.2 Vektor-Primer

T7	5'-gaa ttg taa tac gac tca cta tag-3'
SP6	5'-gat tta ggt gac act ata gaa tac-3'
pRSET B FOW	5'-gag acc aca acg gtt tcc ctc-3'
pRSET B REV	5'-cta gtt att gct cag cgg tgg-3'

2.7.3 Degenerierte Primer für 5' und 3'TAIL-PCR

TD Tata	5'-gat tct aga (ct)(ct)5 cta ta(at) a(at)a (gc)(ac)-3'
Pf1	5'-gta ata cga ctc act ata ggg aat tc-3'
Pf2	5'-gta ata cga ctc act ata ggy rsm tat awa-3'

5: Inosine

2.7.4 Degenerierte Primer für PKS

pd 0	5'-aa(ag) gci at(act) aa(ag) ga(ag) tgg gg-3'
pd 1	5'-gci at(act) aa(ag) ga(ag) tgg ggi-3'
pd 2	5'-atg atg ta(ct) ca(ag) ca(ag) ggi tg-3'
pd 3	5'-cci cci gg(ag) tgi gc(agt) atc-3'
pd 4	5'-aai cc(ag) aai a(ag)i aci ccc c-3'
pd 5	5'-(ct)(at)i ggi tg(ct) (gt)(act)i gci ggi-3'
pd 6	5'-ati c(gc)i (gc)(gt)i cci cci gg(ag) tg-3'
5BPSdpsense	5'-atg gci cci gci atg ga(ag) ta(ct)-3'
5CHSdpsense	5'-atg gti aci gti ga(ag) ga(ag) gti-3'

i: Inosine

2.7.5 Gen-spezifische Primer der mutmaßlichen Isobutyrophenon-Synthase cDNAs

cDNA-Fragment 1

5 F1 orf	5'-gca tgc tag cat ggt (at)ac (at)gt tga gga ggt (ct)ag-3'
5 32 F1 orf	5'-gca tgc tag cat ggt aac tgt tga gga ggt cag-3'
5 33 F1 orf	5'-gca tgc tag cat ggt tac agt tga gga ggt tag-3'
3 F1 orf	5'-gta cgg tac cct agg cgg cgg cct gg-3'
3 F1 orf kurz	5'-gta cgg tac cct agg cgg cgg c-3'
F1.REV3	5'-cgg cga cca gta gtc gca cat ctt a-3'
F1.REV4	5'-tct cct ccg tca ggt gca tgt ac-3'
Frag.1.1.459 R2	5'-gga aga ggg gtt tct cga gg-3'

Frag.1.1.459 F1	5'-cct cga gaa acc cct ctt cc-3'
Frag.1.1.459 R1	5'-acc atg gag tcg agg tgg gtc-3'
Frag.1.1.459 F2	5'-cca cct gct aaa gga cgt gcc a-3'
Frag.1.1.255 R1	5'-cag aag acg agg tga gtg atc-3'
Frag.1.1.255 R2	5'-cgc ctc ctt ccc gag ctt g-3'
Frag.1.1.255 F1	5'-gat cac tca cct cgt ctt ctg c-3'
Frag.1.1.255 F2	5'-caa gct cgg gaa gga ggc g-3'
ibps2r1	5'-atg cgg aga cga gct gga ag-3'
ibps2r2	5'-aag gtg aca gcc gtg atc tc-3'
BUS anti.1	5'-tga tac gag ctg gaa gag tgg-3'
BUS anti.2	5'-gtc gct gag cac ttg tcg g-3'
IBP Rev3	5'-gtc gag gga cgg cga cca gta-3'

cDNA-Fragment 2

F2R3	5'-gtc ctt ggc taa cct aag gac-3'
Frag.2.F1	5'-tgg act aac att cca tct tcg-3'
Frag.2.R2	5'-gtc aat att ctt cga gat aag ctc-3'
Frag.2.R1	5'-tgt cca tat ggg ttt cac ttg gg-3'
Frag.2.F2	5'-ccc aag tga aac cca tat gga ca-3'
ibps1r1	5'-ctc agg gac agg atc tga ac-3'
ibps1r2	5'-ctt gct cca tct cca aat atg gc-3'

cDNA-Fragment 3

Frag.3.F2	5'-agg gct tac att tca cct tct c-3'
Frag.3.R2	5'-ctg tca agg tgg gtg tca cta-3'
Frag.3 F1	5'-tag tga cac cca cct tga cag-3'
Frag.3 R1	5'-caa ggg ctt ctc gac ttc ggg ca-3'

cDNA-Fragment 4

Frag.4 F2	5'-gtg gcc taa tgt gcc tac ttt g-3'
Frag.4 R2	5'-caa agt agg cac att agg cca-3'
Frag.4 R1	5'-gcc aac tag gga gtc caa agc a-3'
Frag.4 F1	5'-gtt cga ttg aac gac cac tct tc-3'
ibps3f1	5'-tcg att gaa cga cca ctc ttc c-3'
ibps3f2	5'-ctt gac gcg gtt gaa gca aaa ctc-3'
ibps3r1	5'-gcc aca aat gaa agg tga gac-3'
ibps3r2	5'-cag acc cat cac caa aaa gg-3'

2.8 Geräte

Autoklav	Vapoklav	Sterilco
Elektrophorese	Mini-sub [®] Cell GT Wide Mini- sub [®] Cell GT Power Pac 300	BioRad BioRad Biorad
Gel Kammer		Biorad
Geldokumentation	Multimage TM Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Gefriertrockner	Alpha	Christ
Mikrowelle	Optimo	Moulinex
PCR-Thermoblock	T-Personal Professional Gradient	Biometra Biometra
pH-Meter	Digital pH Meter 325	WTW
Photometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech
Reinluft	LaminAir HLB 2472	Heraeus
Reinstwasser	Milli-Q Reagent	Water Millipore
Speed Vaccum	RVC2-18	Christ
Sequenzierer	ABI Prism 377	Appl. Biosystems
Schüttler	HT	Infors Binder
Temperierung	Dri-Block [®] DB 30	Techne
Vakuumkonzentrator	Genelac SF 50	Biometra
Vortex	VF2	J. & K. Labortechnik
Waagen	Analysen- und Feinwaage	Sartorius
Wasserbad	Typ 3041 Exatherm U3	Köttermann Julabo
Zentrifugen	Universal 32R Biofuge 13 Biofuge pico	Hettich Heraeus Sepatech Heraeus

2.9 Computerprogramme

Auswertung von Sequenzen:

DNASTAR 5.0, DNASTAR Inc., Madison, USA

BLAST am National Institute of Health: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

3. Gentechnische Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

3.1.1 Intakte Pflanzen

Zwischen Juni und September wurden *H. calycinum*- (Abb. 2.1) und *H. perforatum*-Pflanzen (Abb. 2.2) im Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig geerntet. Verschiedene Organe der Pflanzen wurden eingesetzt. Bei *H. calycinum* wurden Fruchtknoten aus Knospen und Blüten sowie Früchte geerntet. Bei *H. perforatum* wurden nur Knospen und Früchte gesammelt. Diese Organe wurden direkt für die RNA- und DNA-Isolierungen verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C für spätere Untersuchungen gelagert.

3.1.2 Zellkulturen von *Hypericum calycinum*

Die Zellkultur von *H. calycinum* wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert und wächst im Dunkeln in zwei verschiedenen Kulturflüssigmedien (LS und BDS-Medium). Das LS-Medium (Abb. 2.4) wurde für die Erhaltung der Zellkultur verwendet. Jeden siebten Tag wurde das Medium erneuert. In diesem Medium waren die Zellen gelb gefärbt und vermehrten sich schnell. Sie dienten zum Anlegen einer Zellsuspension in BDS-Medium (Abb. 2.5).

Für die Untersuchung der Hyperforin-Biosynthese wurde die Kultur in BDS-Medium angezogen. Nur in diesem Medium konnten die Zellen von *H. calycinum* Hyperforine produzieren. Um den Tag der maximalen enzymatischen Aktivität der Isobutyrophenon-Synthase (BUS) wurde aus den Zellkulturen RNA isoliert. Nach 1 bis 3 Tagen nach Überimpfung in BDS Medium wurde die Zellen durch Vakuumfiltration abgeerntet und das Frischgewicht bestimmt. 100 mg Zellmaterial wurde für die RNA-Isolierung unter sterilen Bedingungen verwendet.

3.2. Anzucht und Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in Dauerkulturen bei - 80 °C als 20 % Glycerin/LB-Medium-Mischungen gelagert. Generell erfolgte die Anzucht von *E. coli* in LB-Medium. Für die Transformation wurde *E. coli* in SOC-Medium angezogen, zum Erhalt von Einzelkolonien auf festem LB-Medium ausplattiert und für Plasmidpräparationen über Nacht (16 - 18 h) in 5 ml LB Medium bei 37°C kultiviert. Für die Proteinüberexpression wurde *E. coli* in 100 ml LB Medium bei 25°C auf einem Rundschtüttler angezogen. Zur Selektion wurde den Medien das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

3.2.1 Lagerung von Bakterienkulturen

Für die kurzfristige Lagerung wurden Kulturen auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum maximal 4 Wochen aufbewahrt. Die langfristige Lagerung erfolgte in Glycerinkulturen bei - 80 °C. Dazu wurde einer Kultur in der logarithmischen Phase (5 ml LB-Medium, 8 h, 37°C) 0,8 ml entnommen und mit 0,2 ml sterilem Glycerin (87 %) vermischt.

3.2.2 Messung der optischen Dichte (OD)

Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der Trübung bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch bestimmt. Zum Null-Abgleich diente die jeweilige unbeimpfte Lösung. Dabei entspricht die Absorption $OD_{600} = 1$ einer Zellzahl von etwa 8×10^8 (Bertram und Gassen, 1991).

3.2.3 Herstellung kompetenter *E. coli*

Die Bakterienstämme wurden nach der Calciumchlorid-Methode für die Transformation kompetent gemacht (Mandel und Higa, 1970). Von einer ausplattierten Dauerkultur wurde eine Kolonie über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und von dieser 1 ml in 50 ml frisches Medium überführt. Bei einer Konzentration von OD_{600} 0,6 - 0,8 wurden die Bakterien in einem Falcon-Röhrchen bei 3.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und mit 50 ml einer eiskalten 0,05 M $CaCl_2$ -Lösung gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 20 ml der $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und die Lösung weitere 20 min auf Eis gehalten. Es wurde wieder zentrifugiert und das Pellet in 940 µl 0,05 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden der Lösung 140 µl Glycerin hinzugesetzt, die Mischung in 50 µl-Aliquote aufgeteilt und diese bei - 80 °C bis zur Transformation gelagert.

3.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide als Primer für die cDNA-Synthese und für die PCR wurden von der Firma MWG-Biotech (Erlangen) synthetisiert. Die für die Fragmentsuche eingesetzten degenerierten Primer und die anschließend verwendeten genspezifischen Primer wiesen eine Länge von 18 - 25 Nukleotiden auf und wurden so gewählt, dass die Schmelztemperatur möglichst zwischen 55 - 65 °C und der GC-Gehalt bei 40 - 60 % lag. Primer für die Fragmentsuche waren entweder durch Mischbasen oder Inosin degeneriert. Mischbasen werden durch anteiliges Vorkommen der Nukleotide bei der Synthese eingeführt und sind in Klammern dargestellt. Inosin wird eingesetzt, um mit A, C, G oder T zu hybridisieren (Case-Green und Southern, 1994). Der Vorteil von Inosin liegt im resultierenden niedrigeren Degenerationsgrad der Primer. Dieser berechnet sich durch die Anzahl der möglichen Basen in einer degenerierten Position. Alle Werte für diese Positionen eines Primers werden miteinander multipliziert. Der Degenerationsgrad sollte 512 nicht überschreiten. Inosin erhält den Faktor 1.

Tab. 3.1: Einige allgemeine Richtlinien für das Design von Standard-PCR-Primern

Länge	18-30 Nucleotide
Nucleotidzusammensetzung	GC-Gehalt: 40-60%
Annealing-Temperatur	5°C unter T_m (als Ausgangswert; optimale Temperatur muss in der Regel empirisch ermittelt werden)
Schmelztemperatur T_m	Vereinfachte Formel zur Berechnung von T_m : $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$
Sequenz am 3'-Ende	<ul style="list-style-type: none"> - Komplementarität von zwei oder drei Basen an den 3'-Enden der Primerpaare vermeiden (da sonst erhöhte Wahrscheinlichkeit von Primer-Dimerbildung) - Wiederholung von drei oder mehr Gs oder Cs am 3'-Ende vermeiden - Kein T am 3'-Ende; Primer mit endständigem T sind anfälliger für Basenfehlpaarungen

3.3.1 Einbau von Restriktionsschnittstellen in Expressionsprimer

Bei der Konstruktion der Primer für die Amplifikation von offenen Leserahmen (ORF) wurden Restriktionsschnittstellen eingebaut. Diese Restriktionsschnittstellen wurden der jeweiligen multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Expressionsvektors für eine gerichtete Ligation angepasst und waren am 5'-Terminus durch drei angehängte Nukleotide geschützt. Bei der Klonierung in Vektoren, die für ein Fusionsprotein kodieren, ist auf die Einhaltung des Leserasters zu achten. Die Schnittstellen müssen im Primer so lokalisiert sein, dass es nach der Ligation des Inserts in den Vektor an der Fusionsstelle zu einem rastergenauen Übergang des Tripletcodes kommt. Die veränderten Hybridisierungsbedingungen von Primer und Matrize müssen dabei berücksichtigt werden.

3.4 Isolierung von RNA

3.4.1 Isolierung von poly(A⁺)-RNA

Poly(A⁺)-RNA zur Synthese von cDNA wurde aus Suspensionskulturen von *H. calycinum* um den Tag der maximalen enzymatischen BUS-Aktivität und aus ausgewählten Organen von *H. calycinum*- und *H. perforatum*-Pflanzen gewonnen. Die Zellkulturen wurden durch Vakuumfiltration geerntet. 250 mg der so erhaltenen Zellen bzw. Knospen und Früchte wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zermahlen und 100 mg des feinen Pulvers für die mRNA-Gewinnung mit Hilfe des illustra QuickPrepTM Micro mRNA Purification Kits der Firma Amersham Biosciences eingesetzt. Die Gewinnung erfolgte nach den Herstellerangaben.

Diese Methode beruht auf Tensidlyse des Zellmaterials und Adsorption an eine Cellulose-oligo(dT)-Affinitätsmatrix. RNasen werden dabei durch Guanidiniumthiocyanat inhibiert. An die Matrix gebundene poly(A⁺)-RNA wird nacheinander mit hoch und niedrig konzentrierten Puffern gewaschen, schließlich durch Zugabe von Glykogen, Kaliumacetat und Ethanol eluiert. Die frische so gewonnene poly(A⁺)-RNA wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen und entweder direkt für die reverse Transkription verwendet oder bei - 80 °C für spätere Untersuchungen gelagert.

3.4.2 Isolierung von gesamt-RNA

Die Isolierung von gesamt-RNA wurde aus Suspensionskulturen und Pflanzenmaterial mit Hilfe des NucleoSpin RNA Plant Kits durchgeführt. Dazu wurde Zellmaterial mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. 100 mg des Pulvers wurden in Extraktionspuffer gelöst, durch Filtration von zellulären Bestandteilen befreit und an eine Kieselgelmatrix adsorbiert. Nach Verdau von DNA durch DNase I wurde die RNA auf der Matrix gewaschen und abschließend mit 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde direkt für RT-PCR-Verfahren verwendet oder bei - 80°C für spätere Untersuchungen gelagert.

Zur Verfügung standen für die Gesamt-RNA-Isolierung auch das MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit der Firma Epicenter Biotechnologies und das RNeasy System der Firma Qiagen®. Die RNA-Gewinnung erfolgte nach den Herstellerangaben.

3.5 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA aus Pflanzen wurde mit Hilfe des DNeasy Systems der Firma Qiagen® gewonnen. Dabei wurden 100 mg Pflanzen-Material in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 400 µl AP1 Puffer + 4 µl RNase A gelöst und 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Die folgenden Reinigungs- und Waschschrte erfolgten analog dem DNeasy-Protokoll. Die genomische DNA wurde anschließend mit 100 µl AE Puffer eluiert und direkt verwendet oder bei - 20 °C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt.

Außerdem verwendet wurde für die Isolierung genomischer DNA das MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit der Firma Epicenter Biotechnologies. Dabei wurde die DNA laut dem Protokoll isoliert. Die DNA wurde anschließend mit 35 µl TE Puffer eluiert und direkt verwendet oder bei - 20 °C gelagert.

3.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer Absorption von UV-Licht photometrisch quantifiziert werden. Die Konzentration von Nukleinsäuren [c] über die Absorption A wurde nach Sambrook et al. (1989) bestimmt, wobei die Absorption bei 260 nm photometrisch vermessen wurde.

$$[c] = A * \epsilon_{260} * \text{Verdünnung}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient

Der Extinktionskoeffizient ϵ für $\lambda = 260$ nm beträgt:

ssDNA = 1,0 A ~ 50 ng/μl

dsDNA und RNA = 1,0 A ~ 33 ng/μl

Oligonukleotide = 1,0 A ~ 20 ng/μl

Bei 280 nm werden Proteine erfasst. Das Verhältnis von $\lambda = 260$ nm / $\lambda = 280$ nm ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch z.B. Proteine hin, die bei $\lambda = 280$ nm absorbieren. Die Genauigkeit der Methode reicht bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 100 ng/μl. Folgende Tabelle wurde für die Berechnung der Plasmid-DNA Konzentration verwendet.

Tab. 3.2: Berechnung der Plasmid-DNA Konzentration

	Plasmid-DNA	Blind
H₂O	490 μl	490 μl
Plasmid-DNA	10 μl	x
Optische Dichte (OD) bei 260 nm	OD Plasmid-DNA	OD Blind

$$\text{Plasmid-DNA Konzentration (ng/μl)} = (\text{OD Plasmid-DNA} - \text{OD Blind}) \times 2500$$

3.7 Fällung von DNA

Die Präzipitation von DNA mit Ethanol oder Isopropanol diene sowohl der DNA-Konzentrierung als auch der weitgehenden Abtrennung niedermolekularer Bestandteile. DNA wurde mit 40 μl Wasser, 5 μl 3 M Natriumacetat-Lösung und 125 μl Ethanol gefällt und für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde 2 x mit je 300 μl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min bei 13000 rpm) und dann bei maximal 37 °C getrocknet.

3.8 cDNA Synthese

Die gewonnene Poly(A⁺)-RNA und Gesamt-RNA wurden für die Erststrang-cDNA-Synthese mit Hilfe reverser Transkriptasen verwendet. Bei der reversen Transkriptase handelte es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

3.8.1 5'- und 3'-RACE mittels SMART-Verfahren

Die Synthese der 3'-RACE-cDNA und der 5'-RACE-cDNA wurde analog dem SMART-RACE Verfahren der Firma Clontech durchgeführt. Das SMART-RACE-Verfahren beinhaltet eine Ankerprimer-Technik.

3.8.1.1 cDNA-Synthese mittels M-MuLV Reverse Transcriptase

Poly(A⁺)-RNA (1 ng - 500 ng) und Gesamt-RNA (10 ng - 5 µg) dienen als Matrize für die cDNA-Erststrang-Synthese.

Für die Standard Reverse Transkription wurden 5 - 11 µl RNA als Matrize verwendet und diese mittels RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase oder Reverse Transcriptase der Firma Fermentas bei 42 °C in cDNA transkribiert. Diese Enzyme basieren auf einer Moloney-Murine Leukemia Virus-Reversen Transkriptase (M-MuLV-RT). Erststrang-cDNA-Synthese wurde darüber hinaus mit diesen reversen Transkriptasen ohne (TdT)-Aktivität durchgeführt. Die RNase-Aktivität dieses Enzyms war durch eine Punktmutation in der H-Domäne unterbunden. Für die cDNA-Synthese wurden bis zu 11 µl Gesamt-RNA verwendet und die Reaktion wurde mit Oligo dT-Primern, Random-Primern oder genspezifischen Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um Störungen der PCR durch RNA-Reste zu vermeiden, wurde der Ansatz nach abgeschlossener Reaktion mit *E. coli*-RNase H für 20 min bei 37 °C inkubiert. Folgende Komponenten wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt, 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis platziert (2 min).

Tab. 3.3: 3'- und 5'- RACE-cDNA Synthese mittels M-MuLV Reverse Transcriptase

3'-RACE-cDNA Synthese

Komponente	Volumen
poly(A ⁺)-RNA (1 ng- 0,5 µg)	7 µl
3'-CDS Primer	1 µl
Nukleasen-freies Wasser	3 µl

5'-RACE-cDNA Synthese

Komponente	Volumen
Poly(A ⁺)-RNA (1 ng- 0,5 µg)	7 µl
Smart II oligo Primer	1 µl
5'-CDS Primer	2 µl
Nukleasen-freies Wasser	1 µl

Danach wurden zu beiden Ansätzen folgende Komponenten zupipettiert:

Komponente	Volumen
5x Puffer für die Erststrang-Synthese	4 µl
RNase-Inhibitor (40 Units/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
Nukleasen-freies Wasser	1 µl

Die Ansätze wurden bei 37 °C 5 min inkubiert. Danach wurden zu beiden Ansätzen 1 µl RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase zupipettiert. Erneut wurden die Ansätze diesmal bei 42 °C 60 min, dann bei 70 °C 15 min inkubiert. Um die RNA vollständig

zu entfernen, wurden 1 µl (1 Unit) *E. coli*-RNase H und 1 µl (1 Unit) RNase T zugegeben und der komplette Ansatz wurde 20 min bei 37 °C inkubiert.

Für GC-reiche und dadurch schwer zugängliche RNA wurde die reverse Transkriptase Thermoscript der Firma Invitrogen Life Technologies verwendet. Dieses Enzym katalysiert die reverse Transkription bei Temperaturen bis zu 60 °C.

Verwendet wurde auch Superscript II und III der Fa. Invitrogen Life Technologies und PowerScript™ Reverse Transcriptase der Fa. CLONTECH Laboratories. Dabei wurde die cDNA aus der RNA laut dem oben aufgeführten Reaktionsprotokoll synthetisiert.

3.8.1.2 cDNA-Synthese mittels PrimeScript™ Reverse Transcriptase

Mit Hilfe von PrimeScript™ Reverse Transcriptase der Fa. Takara BIO INC wurden 3'-RACE-cDNA- und 5'-RACE-cDNA-Synthesen durchgeführt. Die Terminal-Nukleotid-Transferase-Aktivität (TdT) der reversen Transkriptase erlaubt dabei die Verlängerung der Matrizen-RNA um den SMART II-Primer durch Anfügen von Desoxycytidinresten an die neu gebildete cDNA. Die so um eine bekannte Sequenz 5'-terminal erweiterte cDNA kann für die 5'-RACE-PCR verwendet werden. cDNA-Synthese mittels 3'-CDS-Primer wurde für die Aufklärung der 3'-Termini mit Hilfe der 3'-RACE-PCR durchgeführt. Als 3'-CDS-Primer diente ein um die SMART II- Sequenz erweiterter Oligo(dT)-Primer. Folgende Komponenten wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt, 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis platziert (2 min).

Tab. 3.4: 3'- und 5'- RACE-cDNA-Synthese mittels PrimeScript™ Reverse Transcriptase

3'-RACE-cDNA Synthese

Komponente	Volumen
Poly(A ⁺)-RNA	7 µl
3'-CDS Primer	1 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
Nukleasen-freies Wasser	1 µl

5'-RACE-cDNA Synthese

Komponente	Volumen
Poly(A ⁺)-RNA	7 µl
Smart II oligo Primer	1 µl
5'-CDS Primer	1 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
Nukleasen-freies Wasser	x

Danach wurden zu beiden Ansätzen folgende Komponenten zupipettiert:

Komponente	Volumen
5 x PrimerScript Puffer	4 µl
RNase-Inhibitor (40 Units/µl)	1 µl
PrimeScript™ Reverse Transcriptase	0,5 µl
Nukleasen-freies Wasser	4,5 µl

Erneut wurden die Ansätze diesmal bei 42 °C 60 min, dann bei 70 °C 15 min inkubiert. Um die RNA vollständig zu entfernen, wurden 1 µl (1 Unit) *E.coli*-RNase H und 1 µl (1 Unit) RNase T zugegeben und der komplette Ansatz wurde 20 min bei 37 °C inkubiert.

Die gewonnenen cDNAs wurden für die PCR eingesetzt, um die full length cDNA oder den ORF zu isolieren, oder für weitere Untersuchungen bei - 20 °C gelagert.

3.8.2 Synthese von 5'-cDNA mittels Terminaler Transferase

Die reverse Transkription wurde wie unter 3.8.1 beschrieben durchgeführt. Als Oligonukleotid wurde ein oligo-dT Primer eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde mit einem DNA Purification Kit der Fa. Macherey&Nagel oder OLS[®] Omni Life Science aufgereinigt und in 50 µl 10 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 aufgenommen. Ein Aliquot davon (10 µl) wurde zusammen mit 6,5 µl Nuklease-freiem Wasser, 5 µl 5x Tailing-Puffer und 2,5 µl 2 mM dCTP für 2 min bei 94 °C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1 µl TdT Enzym (Terminale Transferase) 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann bei 65 °C nach 10 min gestoppt. Der so gebildete oligo-dC Rest diente in der folgenden Reaktion als Bindungsstelle für einen oligo-dG Ankerprimer (AAP; AUAP).

3.9 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient als exponentielle Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Das Prinzip der PCR ist eine exponentielle enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonucleotid-Primern. Die Primer sind gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden. Als Matrize (template) für die PCR dienen genomische DNA, Plasmid-DNA und cDNA (revers transkribierte RNA). Die DNA-Polymerase fügt Nucleotide an die 3'-OH-Gruppe von Primern an und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen. DNA-Polymerasen für die PCR werden aus thermoresistenten Organismen gewonnen und von verschiedenen Anbietern rekombinant hergestellt. Man unterscheidet DNA-Polymerasen ohne Exonukleaseaktivität (z.B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) von so genannten Proofreading-Polymerasen (z.B. *Pfu*-, *Pfx*-, *Pwo*-Polymerase). Letztere weisen die geforderte 3'→5'-Exonukleaseaktivität auf und werden daher z.B. für DNA-Amplifikationen mit anschließender Klonierung in Expressionsvektoren eingesetzt. Solche Polymerasen sind in der Lage, falsch eingebaute Basen zu korrigieren und die Fehlerrate wesentlich zu erniedrigen. Die mittels einer proofreading-Polymerase synthetisierte DNA wurde in einen Expressionsvektor kloniert.

Tab. 3.5: Vergleich von *Taq*-Polymerase und *Pfu*-Polymerase

<i>Taq</i>-Polymerase	<i>Pfu</i>-Polymerase
Polymerase aus dem Eubakterium <i>Thermus aquaticus</i>	Polymerase aus dem Archaeobakterium <i>Pyrococcus furiosus</i>
Am häufigsten eingesetztes Enzym für die meisten PCR-Anwendungen	Klonierung von PCR-Produkt in Expressionsvektor oder bei der ortsspezifischen Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i>)
Halbwertszeit von 5 min bei 100 °C Temperaturoptimum von 75°C	Halbwertszeit von 4 min bei 95 °C
Keine 3'→5'-Exonucleaseaktivität	3'→5'-Exonucleaseaktivität (<i>proofreading</i> -Aktivität)
Hängt ein überstehendes Adenosin an das 3'-Ende der Produktstränge an, sodass die entstehenden PCR-Produkte effektiv in TA- oder UA-Vektoren kloniert werden können.	Hängt kein überstehendes Adenosin an das 3'-Ende der Produktstränge an, so dass die entstehenden PCR-Produkte glatte Enden aufweisen, was für die Klonierung solcher Produkte von wesentlicher Bedeutung ist.

Standard-PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe der Omnitag-OLS[®]-DNA-Polymerase der Fa. OLS[®] Omni Life Science durchgeführt. Omnitag-OLS[®]-DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7.) ist eine ursprünglich aus *Thermus spec.* isolierte, gentechnisch veränderte, thermostabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase und wurde rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Das Enzym verfügt über folgende Eigenschaften: 5'→3'-Polymeraseaktivität (60 - 150 Nukleotide/sec, ca.1 kb/min), 3'→5'-Exonukleaseaktivität („strand displacement“) und eine 3'-terminale Desoxynukleotidyl-Transferaseaktivität (erzeugt 3'-dA-Nukleotidüberhänge). Für die Initialisierung der Polymerisation ist die korrekte Basenpaarung der letzten drei Basen am 3'-Ende des angelagerten Primers ausreichend. Die Passgenauigkeit der 5'-Region des Primers ist nahezu unkritisch. Die Einführung neuer Restriktionsschnittstellen in das Amplifikat ist somit einfach und schnell möglich. Bis zu 5 kb DNA können amplifiziert werden. Die spezifische Aktivität des Enzyms liegt bei 50.000 units/mg Protein. Standard-PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Tab. 3.6: Standard-PCR-Reaktion

Master Mix 1	Volumen
H ₂ O	12 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
cDNA	1 µl

Erste Denaturierung bei 95°C, dann Zugabe von Master Mix 2 .

Master Mix 2	Volumen
Puffer-MgCl ₂	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP Mix	1 µl
H ₂ O	5,4 µl
<i>Taq</i> Polymerase unverdünnt	0,1 µl

Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnitts erfolgte in drei Schritten:

1. Denaturierung:

Die DNA wird bei 94 °C 15 - 30 s in zwei Einzelstränge getrennt.

2. Annealing:

Je nach Schmelztemperatur der Primer wird die Temperatur auf 40 - 65 °C für 40 s gesenkt (die Temperatur lag in der Regel 5 °C unter dem Schmelzpunkt der angewandten Primer). Die Schmelztemperatur TS von Oligonukleotiden lässt sich wie folgt berechnen:

$$TS = (NA + NT) \times 2 \text{ °C} + (NC + NG) \times 4 \text{ °C}$$

A, C, G und T bezeichnen die Nukleotide.

Die Formel ist allerdings nur für kurze Primer mit einer Länge um 20 Basen verwendbar. Die Schmelztemperatur hängt nicht nur von der Basenzusammensetzung, sondern auch von der Sequenz ab. Die genaue Temperatur wurde von der Fa. MWG ermittelt. Die Anlagerungstemperaturen der Primer wurden 3 - 10 °C unterhalb ihrer Schmelztemperaturen gewählt.

3. Extension:

Bei 72 °C bzw. 68 °C wird der komplementäre DNA-Strang durch Verlängerung des Primers hergestellt. Allgemein gilt, dass für 1000 bp eine Elongationszeit von einer Minute ausreicht.

Der Zyklus wurde 25 - 30 x durchlaufen. Bei Verwendung der *Taq*-Polymerase erfolgte eine finale Extension für 10 min bei 72 °C.

Standardmäßig wurde die Hot-Start PCR durchgeführt, d.h. die *Taq*-Polymerase wurde nach einer anfänglichen zweiminütigen Denaturierung der Matrize zu dem Reaktionsansatz zugegeben. Diese Vorgehensweise gewährleistet eine möglichst hohe Spezifität der Reaktion. Die Denaturierung erzwingt eine Aufspaltung der doppelsträngigen Matrizen-DNA in DNA-Einzelstränge. Ein Standardtemperaturprogramm für die PCR mit *Taq*-Polymerase zeigt die folgende Tabelle:

Tab. 3.7: Standard-PCR-Programm

Schritt-Nr.	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus
1	Start-Denaturierung	94	120	1x
2	Pause	70	0	
3	Denaturierung	94	30	25-30x
4	Annealing	55	40	
5	Elongation	72	90	
6	Finale Elongation	72	600	1x
7	Pause	10	0	

Bei Verwendung von *Pfu*-Polymerase wurde die Elongation bei 68 °C für 4 min und die terminale Elongation für 20 min durchgeführt. *Pfu*-PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Tab. 3.8: *Pfu*-PCR-Reaktion

Master Mix	Volumen
H ₂ O	38,5 µl
Buffer+MgSO ₄	5 µl
dNTP mix	1,5 µl
Primer 1	1,25 µl
Primer 2	1,25 µl
cDNA	2 µl
<i>Pfu</i> -polymerase	0,5 µl

Tab. 3.9: *Pfu*-PCR-Programm

Schritt-Nr.	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus
1	Start-Denaturierung	95	120	1x
2	Pause	70	0	
3	Denaturierung	95	30	25x
4	Annealing	55	40	
5	Elongation	68	240	
6	Finale Elongation	68	1200	1x
7	Pause	12	0	

Für eine möglichst hohe und spezifische Ausbeute wurden die PCR-Bedingungen variiert und für jede Matrize und jedes Primerpaar optimiert.

3.9.1 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die RACE-Technik stellt eine PCR-Methode zur Identifizierung unbekannter 3'- und 5'-Regionen von cDNA-Fragmenten dar (Frohman et al., 1988). Das Verfahren beruht auf einer Verknüpfung der cDNA-Enden mit einem Ankerprimer, welcher während der cDNA-Synthese eingeführt wird. Diese artifiziellen Enden können während der PCR mit RACE-Primern und einem genspezifischen Primer zur Aufklärung des offenen Leserahmens (ORF) genutzt werden. Diese Art der PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. In einer ersten Amplifikation wurde die Reaktion mit einem genspezifischen Primer und dem RACE-Long Primer durchgeführt. In einer zweiten Amplifikation wurde das Produkt der ersten Reaktion als Matrize eingesetzt. Hierbei wurde der RACE-Short Primer und ein weiterer, ebenfalls innerhalb der bereits amplifizierten Sequenz gelegener, genspezifischer Primer verwendet. Durch dieses auch nested-PCR genannte Verfahren lässt sich die Spezifität der Methode deutlich erhöhen.

3.9.2 Touch-down-PCR

Falls sich die Schmelztemperaturen eines Primerpaares unterschieden oder nicht genau errechenbar waren, wurden manche DNA-Abschnitte im sog. Touch-down-PCR-Programm gewonnen. Hier wurde in den ersten 10 Zyklen pro Zyklus die Annealing-Temperatur jeweils um 0,5 bzw. 1 °C gesenkt. Anschließend wurden bei der zuletzt erreichten Temperatur 20 Zyklen einprogrammiert. Die folgende Tabelle stellt das Thermocycler-Programm einer Touch-down-PCR dar.

Tab. 3.10: Standard Touch-Down-PCR Programm

Schritt-Nr.:	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus	
1	Start-Denaturierung	95	120	1x	
2	Pause	70	0		
3	Denaturierung	94	30	9x	-1,0 °C
4	Annealing	65-55	40		
5	Elongation	72	90		
6	Denaturierung	94	30	19x	
7	Annealing	55	40		
8	Elongation	72	90		
9	Finale Elongation	72	600	1x	
10	Pause	12	0		

3.9.3 Nested-PCR

Mit der nested-PCR können amplifizierte DNA-Fragmente genauer charakterisiert werden. Das Verfahren besteht aus zwei aufeinanderfolgenden PCR. Dabei dient das Produkt der ersten PCR als Matrize für die zweite Amplifikation. Sollte es bei der ersten PCR zur

Amplifikation einer unspezifischen Sequenz gekommen sein, liefert die zweite PCR kein Produkt mehr, da die Primer nicht zu der Vorlage komplementär sind.

3.9.4 RT-PCR

Die RT-PCR stellt eine Kombination zweier Verfahren dar. Zunächst wird eine reverse Transkription durchgeführt und anschließend eine Polymerasekettenreaktion. Die RT-PCR wurde ausschließlich mit genspezifischen Primern durchgeführt. Sie wurde eingesetzt, um die Transkription verschiedener Gene in untersuchten RNA-Präparationen zu beurteilen und ist im Gegensatz zur Real Time RT-PCR ein semi-quantitatives Verfahren.

3.9.5 Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR)

Die genomische DNA wurde für die *Thermal asymmetric interlaced PCR* (TAIL) isoliert. Diese PCR bietet die Möglichkeit die unbekannte flankierende Sequenz neben der T-DNA zu identifizieren. In diesen PCR-Reaktionen verwendet man eine Anzahl von nested Sequenz-spezifischen Primern (NP1, NP2 und NP3) für die T-DNA zusammen mit kurzen degenerierten Primern (TD Tata, Pf1 oder Pf2), welche eine niedrige Schmelztemperatur besitzen und unspezifisch an die genomische DNA binden. Die Annealingtemperatur wird durch die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der spezifischen Primer bestimmt. Die TAIL-PCR ist in folgender Tabelle beschrieben.

Tab. 3.11: TAIL-PCR Programm

Reaktion	Zyklenzahl	Programm
Primär	1	95°C 2min
TD Tata, Pf1 oder Pf2 vs. NP1	5	94°C 1min, 62°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	94°C 1min, 25°C 3min, 72°C 2min30sec
	15	94°C 30sec, 62°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	92°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min
Sekundär	20	94°C 30sec, 64°C 1min, 72°C 2min30sec
TD Tata, Pf1 oder Pf2 vs. NP2	1	94°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min
Tertiär	20	94°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
TD Tata, Pf1 oder Pf2 vs. NP3	1	72°C 5min

3.10 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe der Gelelektrophorese in einer Agarosematrix auftrennen. Zwischen dem Logarithmus der Länge des Fragments und der relativen Wanderungsdistanz besteht eine lineare Abhängigkeit. Je nach erwarteter Größe der zu trennenden Fragmente variierte die Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 2 %. Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst und kurz aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50 - 60 °C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/10 ml) versetzt und in eine Elektrophorese-Kammer mit eingesetztem Taschenformer gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Kamm entfernt und die Taschen wurden mit DNA-Proben beladen. Durch Verwendung eines Eichstandards mit DNA-Fragmenten bekannter Größe kann die Länge der DNA-Fragmente bestimmt werden. DNA-Proben wurden parallel zum DNA-Größenmarker (Eichstandards) elektrophoretisch bei 120 V in TAE-Puffer elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Aufgrund der Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA kann sie im UV-Licht detektiert werden. Agarosekonzentration und angelegte Spannung bedingen die Trennschärfe der Elektrophorese.

Tab. 3.12: Tabelle benutzt für die 1 %-Gel-Herstellung mit Ethidiumbromid

Elektrophorese-Kammer	Agarose	1x TAE-Puffer	Ethidiumbromid
Klein	30 mg	30 ml	1 µl
Mittel	80 mg	80 ml	3 µl
Groß	120 mg	120 ml	5 µl

3.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente lassen sich durch Elektrophorese auf Agarosegelen nach ihrer Größe auftrennen. Um mit den aufgetrennten Fragmenten weiterarbeiten zu können, müssen diese aus der Matrix extrahiert werden. Das zu isolierende Fragment wurde nach der Elektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe eines Gel-Extraktionskits[®] aufgereinigt. Dazu wurden die Gel-Extraktionskits der Firmen Macherey&Nagel und OLS[®] Omni Life Science verwendet. Das Verfahren beruht auf der Schmelze des Gels in Extraktionspuffer bei 50 °C, DNA-Bindung an den Spin Filter und abschließenden Wasch- und Elutionsschritten. Die DNA wird mit 40 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die so extrahierte DNA kann direkt für weitere Arbeitsschritte eingesetzt oder bei - 20 °C gelagert werden.

3.12 Herstellung eines T-Überhangvektors

Der dT-Überhang wird an ein glattes (blunt-end) Ende einer DNA Sequenz addiert (Holton und Graham, 1990). Zur Herstellung eines T-Überhangvektors wurden ca. 10 µg des Vektors p-GEM easy T mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* für 12 - 16 h bei 37 °C inkubiert. Die geschnittene DNA wurde gefällt und in 85 µl bidest. Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl Taq-Polymerasepuffer, 2 µl dT (100 µM) und 6 Units *Taq*-Polymerase zugegeben. Dieser Ansatz wurde für zwei Stunden bei 70 °C inkubiert. Das Syntheseprodukt

wurde über eine Nucleospin[®] Säule (Fa. Macherey&Nagel) oder OLS Säule (Fa. OLS[®] Omni Life Science) aufgereinigt und die DNA Konzentration bestimmt. Falls nötig, wurde die DNA mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 50 ng/μl verdünnt.

3.13 Restriktion mittels Typ-II-Endonukleasen

Restriktionsenzyme lassen sich in drei Klassen einteilen. Typ I- und Typ III-klassifizierte Enzyme sind ATP-abhängig, besitzen Endonuklease- und Methylaseaktivität und schneiden DNA in unterschiedlicher Entfernung zur Erkennungssequenz. Es entstehen Fragmente definierter Länge mit variablen Enden. Die hier verwendeten Typ II Endonukleasen sind nicht ATP-abhängige Enzyme, die Phosphodiesterbindungen der DNA an meist palindromischen Erkennungssequenzen hydrolysieren.

Für den Restriktionsverdau wurde das entsprechende Enzym nach Angaben des Herstellers mit Puffer und DNA versetzt und für 60 min inkubiert. Falls die DNA mit zwei Restriktionsenzymen zu schneiden war, wurde der Puffer gewählt, in dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität aufwiesen.

Tab. 3.13: Standard-Restriktionsansatz

Komponente	Volumen
DNA [50-200 ng/μl]	3 μl
Endonuklease	0,5 μl
10x Reaktionspuffer	2 μl
dH ₂ O	14,5 μl

Tab. 3.14: Beispiel Restriktionsverdau: *EcoR* I

Komponente	Volumen
Plasmid-cDNA	2 μl
<i>EcoR</i> I	0,5 μl
Puffer	2 μl
H ₂ O	15,5 μl

Dann bei 37 °C für 1 h

Tab. 3.15: Beispiel für einen Doppel-Restriktions-Verdau: *Kpn* I / *Nhe* I

Komponente	Volumen
pRSET B, ORF cDNA oder Plasmid-DNA	3 μl
<i>Kpn</i> I (10 u/μl)	2 μl
<i>Nhe</i> I (10 u/μl)	0,5 μl
10 x Buffer Tango [™] (Fa. Fermentas)	2 μl
H ₂ O	12,5 μl

Dann bei 37°C für 3 h.

3.14 Ligation mittels der T4-DNA-Ligase

Linearisierte Plasmidvektoren können mit Hilfe von T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente aufnehmen. Dabei kann man zwischen der Klonierung mit klebrigen Enden (sticky ends) und der Klonierung mit glatten Enden (blunt ends) unterscheiden. Klonierungen in die hier verwendeten Vektoren erfolgten ausschließlich über sticky ends. Bei einer Ligation wird die Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende geschlossen. Für die Ligation mit einem T-Überhangvektor wird das gereinigte, mit *Taq*-DNA-Polymerase gewonnene PCR-Amplifikat eingesetzt. Die *Taq*-Polymerase hängt unspezifisch an das 3'-Ende von PCR-Produkten einzelne Basen an, meistens ein Desoxyadenosin (dA). PCR-Amplifikate, die mit der *Taq*-Polymerase synthetisiert wurden, können so ohne vorausgehenden Restriktionsverdau in einen entsprechenden T-Überhangvektor ligiert werden. Die Ligation mit verschiedenen Vektoren erfolgte laut Herstellerangaben. Für andere Ligationen wurden die Enden der DNA-Fragmente durch Restriktionsenzyme verdaut, so dass klebrige oder glatte Enden entstanden. Das Insert wurde im Überschuss mit entsprechendem Plasmid, Ligationspuffer und der T4-DNA-Ligase entweder 1 h bei Raumtemperatur oder 12 - 16 h bei 4 °C inkubiert. Das molare Verhältnis Insert:Vektor betrug dabei zwischen 3:1 und 10:1. 5 - 7,5 µl. Es wurden die ligierten Plasmid-DNAs für die Transformation von DH5α verwendet. Ein Beispiel des Ligationsansatzes zeigt die folgende Tabelle.

Tab. 3.16: Ligationsansatz mittels T4-DNA-Ligase

Komponente	Volumen
Vektor-DNA [50 ng/µl]	1 µl
Insert-DNA	4 µl
10x Reaktionspuffer	1 µl
T4-DNA-Ligase [5 units/µl]	0,5 µl
dH ₂ O	ad 10 µl

3.15 Klonierung in das pGEM-T Easy Vektor System

Aus der PCR gewonnene DNA-Amplifikate können bei Verwendung von *Taq*-Polymerase direkt in einen T-Überhangvektor kloniert werden. Dabei macht man sich die Eigenschaft der Polymerase zunutze, die DNA-Synthese stets mit einem Überhang eines Desoxyadenosins abzuschließen. Dieser Überhang dient zur Klonierung in den komplementären Desoxythymidin-Überhangvektor, wobei die Insertionsrichtung nicht vorgegeben ist. Der pGEM-T Easy Vektor stellt ein high-copy Plasmid dar, welches benachbart zur Multiple-Cloning-Site (MCS) T7- und SP6-RNA-Polymerasepromotoren besitzt. Die MCS ist ihrerseits in die *lacZ*-Kassette integriert, so dass erfolgreich eingefügte Inserts auf entsprechendem Medium mit X-Gal und IPTG durch Blau-Weis-Selektion identifiziert werden können. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen. Mit pGEM-T Easy erstellte Vektorkonstrukte wurden für die Fragmentanalyse mittels Restriktionsverdau oder Sequenzierung verwendet.

3.16 Klonierung in das pRSET B Vektor System

Wurden offene Leserahmen für die heterologe Expression von Proteinen in das pRSET B Vektor-System ligiert, so wurden bereits die PCR-Primer mit den benötigten Restriktionsschnittstellen versehen. Daraus gewonnene DNA-Amplifikate und der Expressionsvektor wurden mit den entsprechenden Endonukleasen verdaut und der daraus resultierende komplementäre Überhang mittels T4-DNA-Ligase verknüpft. Durch den Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsschnittstellen innerhalb der MCS war eine gerichtete Insertion möglich, so dass eine dem Leseraster folgende Transkription gewährleistet werden konnte. Der pRSET B Vektor verfügt zwischen dem T7-Promotor und der MSC über einen Bereich, der für Polyhistidin (6x His) kodiert. Dieser wird bei der Expression N-terminal an das rekombinante Protein angefügt und dient der späteren Aufreinigung. Der pRSET B Plasmidvektor trägt ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen.

3.17 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli***3.17.1 Herstellung kompetenter Zellen**

Das Verfahren von Cohen et al. (1972) wurde angewendet. Eine *E. coli*-Kolonie wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum auf einem Inkubationsschüttler bei 37 °C angezogen. 1 ml dieser Vorkultur diente als Inokulum für 50 ml LB-Medium, das bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 unter den angegebenen Bedingungen weiterinkubiert wurde. Alle weiteren Schritte wurden bei 0 - 4 °C durchgeführt. Nach Zentrifugation (4 °C, 10 min, 3500 rpm) wurde das Pellet in einer eiskalten 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen vorsichtig in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerin (w/v) resuspendiert und in 50 µl-Aliquots bei - 80 °C gelagert.

3.17.2 Transformation von *E. coli* DH5α

Für den Transfer von Vektorkonstrukten in kompetente Zellen wurden *E. coli*-Stämme verwendet. Pro Ansatz wurden 50 µl CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm DH5α mit 5 µl Plasmid-DNA aus der Ligation gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 45 s bei 42 °C (Hitzeschock) behandelt und dann sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurden 950 µl SOC-Medium oder 700 µl LB-Medium zu den Zellen zugegeben und 1 h bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, ca. 500 µl SOC-Medium oder LB-Medium aufgenommen, der Überstand resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Erfolgreich transformierte Bakterien konnten nach Inkubation über Nacht (37 °C) detektiert werden.

3.17.3 Transformation von *E. coli* in BL21(DE3)pLysS

Der Transfer von Plasmid-DNA in BL21(DE3)pLysS wurde analog mit dem Hitzeschockverfahren durchgeführt. Der BL21(DE3)pLysS *E. coli*-Stamm wurde für die heterologe Expression rekombinanter Proteine eingesetzt. BL21(DE3)pLysS zeichnet sich durch eine zusätzliche Expression von T7 Lysozym aus. T7 Lysozym führt erstens zu einer Unterdrückung der basalen Expression des rekombinanten Proteins und zweitens zur Spaltung von Peptidoglycanbindungen in der Bakterienzellwand, wodurch die spätere Ultraschall-Lyse der Bakterien erleichtert wird. BL21(DE3)pLysS trägt für erweiterte Selektionsmöglichkeiten eine Chloramphenicol-Resistenz. Pro Ansatz wurden 50 µl CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm BL21 mit 1 µl (pRSET B - ORFcDNA) Plasmid-DNA aus der Ligation gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 20 s bei 42 °C (Hitzeschock) behandelt und dann sofort 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurden 950 µl SOC-Medium zu den Zellen zugegeben und 1 h bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, ca. 200 µl SOC-Medium aufgenommen und auf einer LB-Agarplatte mit 20 µl Ampicillin (100 mg/ml) und 30 - 50 µl Chloramphenicol (35 mg/ml) ausplattiert. Erfolgreich transformierte Bakterien konnten nach Inkubation über Nacht (37 °C) detektiert werden.

3.17.4 Insertionskontrolle

Insertionskontrolle von Plasmiden dient der Überprüfung auf erfolgreiche Ligation und Transformation. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Vektoren enthielten alle wenigstens ein Antibiotikumresistenz-Gen. Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (oder mehrerer Antibiotika) zum Anzuchtmedium wurde die erste Selektion auf transformierte und nicht transformierte *E. coli* durchgeführt. Transformierte kompetente *E. coli*-Zellen können sich so auf Selektionsmedium vermehren. Bei Transformationen mit Vektoren, die das lacZ'-Gen zur α-Komplementation der β-Galaktosidase enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Die Agarplatten mit Antibiotikum wurden mit 25 µl 0,5 M IPTG Lösung und 25 µl X-Gal Lösung überschichtet. Der Zellenüberstand wurde anschließend ausplattiert. Bakterienkolonien, in denen durch Insertion die Expression der β-Galaktosidase nicht möglich ist, können nicht das Substrat X-Gal enzymatisch umsetzen und bilden weiße Kolonien. Die erfolgreiche Ligation des Zielfragments wurde nach Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen überprüft. Dafür wurden jeweils das Insert flankierende Schnittstellen des Vektors verwendet und die Größe der Restriktionsfragmente mittels Elektrophorese überprüft.

3.18 Plasmidisolation aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde in *E. coli*-Zellen vom Stamm DH5 α über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler vermehrt.

3.18.1 Plasmid-Minipräparation

Für die Isolierung von Plasmiden aus den verwendeten *E. coli*-Stämmen wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Dolly, 1979) genutzt. Zur Durchführung der Methode wurden 3 ml der Übernachtskultur bei 5000 rpm 5 min zentrifugiert und das Bakterienpellet in 300 μ l Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 μ l Puffer 2 wurde die alkalische Lyse mit SDS eingeleitet. RNase A baute störende RNA während der 5 min-Inkubation bei Raumtemperatur ab. Durch Zugabe von 300 μ l Puffer 3 wurden zelluläre Bestandteile und Proteine während einer Inkubation für 20 min auf Eis gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der klare Überstand (800 μ l) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der abzentrifugierte Überstand wurde mit 1 Volumenanteil Chloroform (800 μ l) extrahiert und die Plasmid-DNA (600 μ l) mit 2/3 Volumenanteil Isopropanol (ca. 420 μ l) aus der wässrigen Phase präzipitiert. Das nach 30 min Zentrifugation sedimentierte Pellet wurde in 70% Ethanol (500 μ l) gewaschen, anschließend bei 37 °C getrocknet und in 60 μ l TE-Puffer oder dH₂O aufgenommen. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde bei - 20 °C für spätere Untersuchungen gelagert oder direkt mit Restriktions-Enzym verdaut. Die Plasmid-DNA Konzentration wurde bestimmt. Die Ausbeuten dieses Verfahrens lagen bei 100 - 500 ng/ μ l.

3.18.2 Plasmid-Minipräparation mit einem Kit

Für die Isolierung reiner Plasmid-DNA wurden Kits nach Angaben der Hersteller verwendet. Die pelletierte Übernachtskultur wurde laut Herstellerangaben (Mini-Plasmid-Purification-kit der Firma MACHEREY-NAGEL) aufgearbeitet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 μ l TE-Puffer eluiert. Die in 50 μ l TE-Puffer eluierte DNA wurde photometrisch bei 260 nm vermessen und bei - 20 °C gelagert.

3.19 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde das automatische Sequenzier-System von Applied Biosystems (Modell 377) verwendet. Das Verfahren beruht auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Dabei wird zunächst eine PCR mit genspezifischen Primern mit Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt. Zusätzlich zu dNTPs werden dem Reaktionsansatz Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt. Aufgrund der fehlenden Verknüpfungsstelle in 3'-Position der Didesoxyribose kommt es bei Einbau eines ddNTPs während der Elongation zum Kettenabbruch. Es werden so während der PCR alle denkbaren Längen der Matrizen-DNA bis zum jeweiligen Abbruch synthetisiert. Die ddNTPs tragen für jedes der vier möglichen Nukleotide jeweils individuelle Fluoreszenzfarbstoffe. Die so entstandenen, unterschiedlich langen ssDNA-Fragmente werden auf einer Polyacrylamidmatrix elektrophoretisch getrennt und das terminale, fluoreszenzmarkierte Nukleotid mittels Laserlichtanregung detektiert.

3.19.1 Probenaufbereitung

Die PCR wurde mit dem BigDyeR Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Kit enthält sämtliche Lösungen für den Premix und die *Taq*-Polymerase. Als Template diente 1 µg (1000 ng) saubere Plasmid-DNA. Die DNA-Konzentration wurde UV-spektroskopisch bei 260 nm bestimmt. Der verwendete Primer war entweder vektor- oder insertspezifisch. Nach Berechnung der Plasmid-cDNA Konzentration (X ng/µl) wurde das Volumen (V_x), das 1000 ng entspricht, berechnet.

$$\begin{aligned} X \text{ ng} &\rightarrow 1 \text{ µl} \\ 1000 \text{ ng} &\rightarrow V_x \end{aligned}$$

$$V_x (\text{µl}) = (1000 \text{ ng} \times 1 \text{ µl}) / X \text{ ng}$$

V_x µl Plasmid-cDNA wurden in ein PCR-Tube pipetiert, getrocknet und anschließend die Sequenzierungs-PCR durchgeführt.

Tab. 3.17: Sequenzierungsansatz

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA [1 µg] oder PCR Produkt [30 ng]	---
ABI - Premix	0,75 µl
Puffer	1,25 µl
Primer [10 pmol/µl]	1 µl
dH ₂ O	ad 10 µl

Tab. 3.18: Thermocycler-Programm

Schritt-Nr.:	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus
1	Denaturierung	96	60	1x
2	Denaturierung	96	30	25x
3	Annealing	50	15	
4	Elongation	60	240	
5	Pause	12	0	

Die Kettenabbruchfragmente wurden nach der PCR durch Ethanol-fällung (250 µl) aus einer 3 M (pH 5,2 bzw. 4,7) Natriumacetatlösung mit 1 µl Glycogen-Lösung (20 µg/µl) von den übrigen Reaktionskomponenten (überschüssige Primer, nicht eingebaute Nukleotide und Dye-Terminatoren) getrennt. Die durch Zentrifugation sedimentierte DNA wurde mit Ethanol (70%) gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurde die DNA in 2 µl Ladebuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt.

3.19.2 Sequenziergel

Die Schichtdicke des Polyacrylamidgels betrug 0,2 mm und bestand aus folgenden Komponenten (Tab. 3.19).

Tab. 3.19: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen zur DNA-Sequenzierung

Komponente	Masse oder Volumen
Harnstoff	9 g
10x TBE-Puffer	3 ml
ddH ₂ O	11,5 ml
Acrylamid/Bis. 30%	3,75 ml
TEMED	10 µl
10% (w/v) APS	200 µl

Durch Zugabe von APS und TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Nach 90 min wurde das Gel mit Produkten der Sequenzierreaktion beladen und im ABI PRISM 377 entwickelt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über die FacturaTM-Software (Perkin Elmer).

3.19.3 DNA-Sequenzierung bei MWG (mwg-biotech.) und GATC

Folgenden Bedingungen wurde gefolgt und anschließend die Plasmid-DNA Proben zur Sequenzierung zu MWG oder GATC geschickt:

Tab. 3.20: Sequenzierung bei MWG

Konzentration	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmid-DNA: 50 – 100 ng/µl - PCR-Produkt: 2 – 10 ng/µl - Kundenprimer: 2 pmol/µl
Volumen	<ul style="list-style-type: none"> - DNA und Primer: je 15 µl in separaten Reaktionsgefäßen - DNA in Wasser oder in 5 mM Tris-HCl (pH 8,0 – 9,0) gelöst und gesendet. - DNA-Proben und Primer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.

Tab. 3.21: Sequenzierung bei GATC

Konzentration	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmid-DNA: 30 – 100 ng/µl - PCR-Produkt: 10 – 50 ng/µl - Kundenprimer: 10pmol/µl
Volumen	<ul style="list-style-type: none"> - DNA und Primer: je 30 µl in separaten Reaktionsgefäßen (ausreichend für 8 Reaktionen) - DNA in Wasser gelöst und gesendet. - Die Lösung darf kein EDTA enthalten. - DNA-Proben und Primer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.

3.19.4 Auswertung der Sequenzierdaten

Die erhaltenen Sequenzen und daraus abgeleitete Aminosäuresequenzen wurden mittels der Software Lasergene 99 DNA STAR bearbeitet. Lasergene 99 DNA STAR enthält 6 Programme für die Auswertung und Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen und bietet Software-Lösungen für vielfältige molekularbiologische Fragestellungen wie SNP Discovery, automatische virtuelle Klonierung, BLAST und Entrez Textsuche, Gene Discovery, Multiple-Sequence-Alignment, Primerdesign oder Oligonucleotid-Design, Proteinstrukturvorhersagen und Sequenzassemblierung.

Tab. 3.22: Softwareprogramme von Lasergene 99 DNA STAR

Softwareprogramme	Beschreibung
SeqMan	Um cDNA-Fragmente nach der Sequenzierung zu versammeln und auszuwerten
GeneQuest	Um Gene, Regulations-Elemente und Strukturen in ihren Primär-DNA-Sequenzen zu lokalisieren
Protean	Um Sekundär-Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften der Protein-Sequenz mit Hilfe von Proteinanalysewerkzeugen vorauszusagen und anzuzeigen
MegAlign	Um Nukleinsäure- oder Polypeptid-Sequenzen zu vergleichen und Multiple-Sequence-Alignment durchzuführen
PrimerSelect	Werkzeuge um Primer zu entwerfen für RT, PCR, Sequenzierung, Hybridisierung und Transkription
EditSeq	Um DNA- und Protein-Sequenz Daten zu importieren und zu bearbeiten

Für initiale Ähnlichkeitssuchen oder Datenbankvergleiche mit bekannten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden die Großdatenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) mit der enthaltenen BLAST Suchoption (Altschul et al., 1997) genutzt. BLAST-Versionen für Homologiesuchen von Protein- oder DNA-Sequenzen in Protein- oder DNA-Sequenzdatenbanken sind in folgender Tabelle vorgestellt.

Tab. 3.23: BLAST

Programm	Sequenz (Query)	Datenbank (Subject)	Kommentar
BlastN	Nukleinsäure	Nukleinsäure	Generiert große Ausgabedateien aufgrund der umfangreichen Datenbanken; sehr niedrige Spezifität und Sensitivität aufgrund niedriger Komplexität der DNA-Sequenz
BlastP	Aminosäure	Aminosäure	Hohe Spezifität und Sensitivität
BlastX	Nukleinsäure	Aminosäure	Translatiert die Eingabesequenz in allen sechs Leserastern und vergleicht dann gegen die Proteinsequenz-Datenbank. Ergibt deutlich spezifischere Resultate als bei Nutzung der blastN-Option
TblastN	Aminosäure	Nukleinsäure	Vergleicht die Aminosäuresequenz gegen die in allen sechs Leserastern translatierte Nukleinsäure-DB. Zeitaufwändiger Vergleich für alle, die sichergehen wollen, keinen Treffer zu verpassen; niedrige Spezifität, hohe Sensitivität.
TblastX	Nukleinsäure	Nukleinsäure	Vergleicht alle sechs translatierten Leseraster der Eingabesequenz gegen alle sechs translatierten Leseraster der Nukleinsäuredatenbank; ultimativer Vergleich, der die Rechenkapazität selbst der großen Institute auf eine harte Probe stellt.

3.20 Heterologe Expression

Zur Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein wurde das jeweilige Genkonstrukt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Vektor pRSET B kloniert. Das Konstrukt wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol zur Selektion ausplattiert. Aus einer 5 ml Übernachtskultur wurden 800 µl in 50 ml frisches LB-Medium ohne Antibiotika-Zusatz inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ 0,6 - 0,8 herangezogen. Die Expression der T7-RNA-Polymerase und damit gleichzeitig die des rekombinanten Proteins wurden durch Zugabe von 20 µl IPTG (100 mM) induziert. Die Expression dauerte bei 22 °C und einer Rotation von 125 rpm über Nacht an. Heterolog exprimierte Protein wurde aus den Bakterien durch Ultraschall-Lyse freigesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung von RNA und Poly(A⁺)-mRNA

In *H. calycinum*-Zellkulturen war die Isobutyrophenon-Synthase-Aktivität vom 1. - 3. Tag nach dem Transfer von Zellen in frisches Medium hoch (Klingauf et al., 2005). Da das Konzentrationsmaximum der spezifischen mRNA der maximalen Enzymaktivität vorausgeht, wurden RNA und Poly(A⁺)-mRNA aus *H. calycinum*-Zellkulturen nach dem 1., 2. und 3. Tag nach Überimpfung in BDS-Medium isoliert. Von *H. perforatum*-Pflanzen wurden Knospen und Früchte für die Isolierung von RNA und Poly(A⁺)-mRNA verwendet. Auf der Basis der Untersuchungen von Gronquist et al. (2001) wurden bei *H. calycinum* Fruchtknoten von Knospen bzw. Blüten sowie Früchte geerntet und dienten als Frischmaterial für die Isolierung von RNA und Poly(A⁺)-mRNA.

4.2 Reverse Transkription

Die Synthese der 3'-cDNA und der 5'-cDNA wurde analog dem SMART-RACE Verfahren der Firma Clontech durchgeführt (3.8). Für die Standard-Reaktion wurden 5 - 11 µl RNA als Matrize verwendet und diese mittels RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase der Firma Fermentas bei 42 °C in cDNA transkribiert (3.8.1.1). Die 5'-cDNA und 3'-cDNA können für die 5'-bzw. 3'-RACE-PCR verwendet werden (Abb. 4.1 und 4.2).

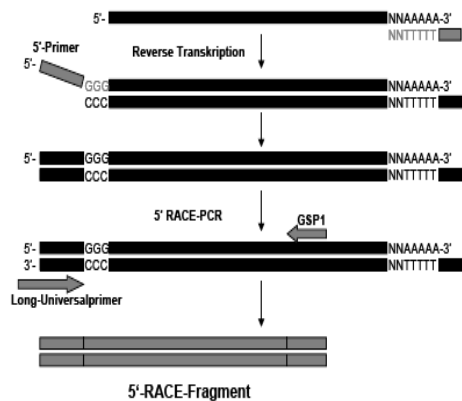


Abb. 4.1: Prinzip der 5'-RACE-PCR

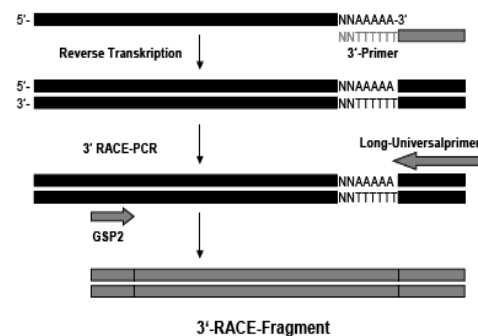


Abb. 4.2: Prinzip der 3'-RACE-PCR

Long-Universalprimer: RACE_{long} oder RACE_{long/short} Primer.

GSP1 und GSP2: Genspezifische Primer, konstruiert für das gegebene cDNA Fragment

Mit Hilfe der PrimeScriptTM Reversen Transkriptase der Fa. Takara BIO INC wurde 5'-cDNA-Synthese durchgeführt, um den offenen Leserahmen (Open Reading Frame, ORF) zu isolieren. Die Terminale-Nukleotid-Transferase-Aktivität (TdT) der reversen Transkriptase erlaubt dabei die Verlängerung der Matrizen-RNA um den SMART II-Primer durch Anfügen von Desoxycytidinresten an die neu gebildete cDNA. Die so um eine bekannte Sequenz 5'-terminal erweiterte cDNA kann für die 5'-RACE-PCR verwendet werden (3.8.1.2).

4.3 Design von degenerierten Primern

Beim Vergleich ausgewählter Typ III Polyketid-Synthasen aus der Datenbank ergab sich eine Homologie auf Aminosäurenebene von 48 bis 73 % (Abb. 4.3 und Tab. 4.1).

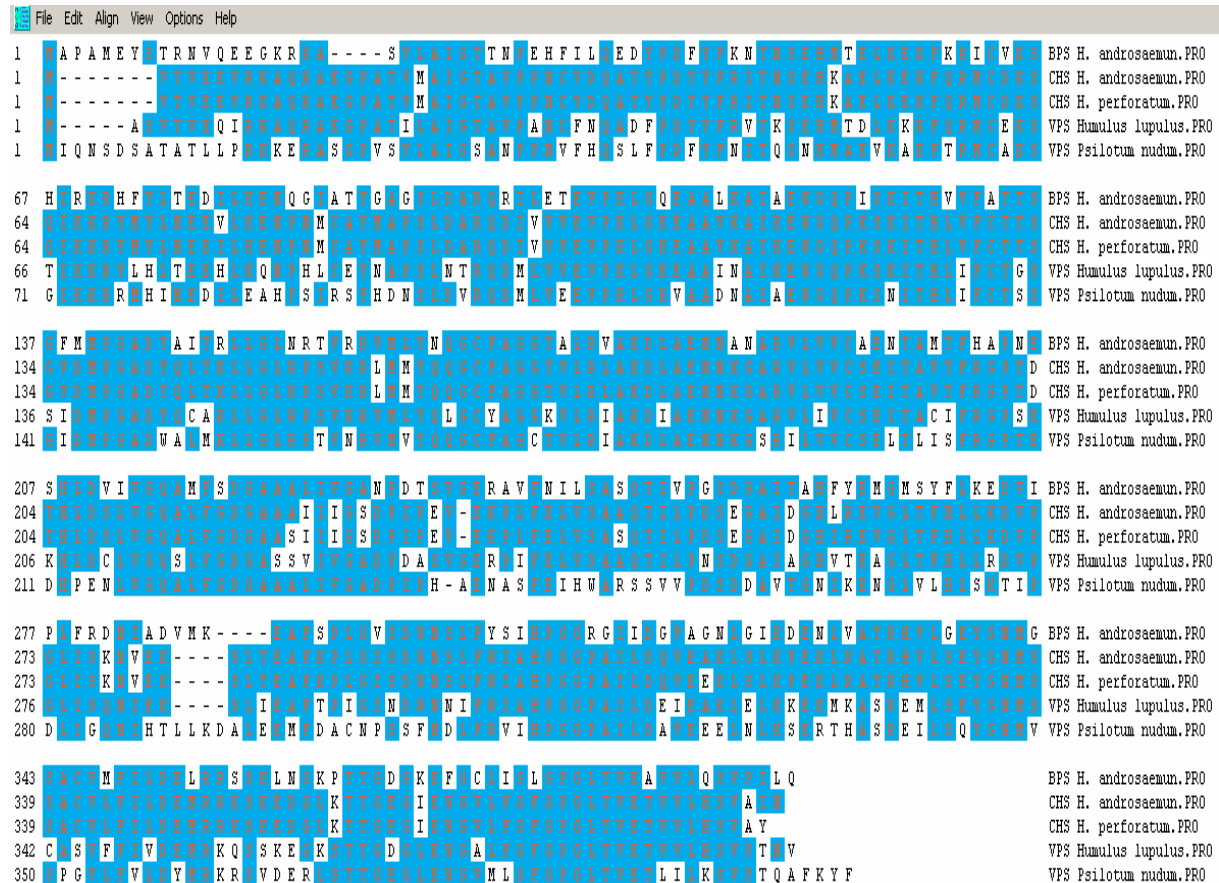


Abb. 4.3: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von fünf ausgewählten PKS III (BPS und CHS aus *H. androsaemum*, CHS aus *H. perforatum*, VPS aus *Humulus lupulus* sowie *Psilotum nudum*)

Tab. 4.1: Prozentuale Identität von ausgewählten PKS auf Aminosäure-Ebene

Identität [%]	1	2	3	4	5
1 BPS <i>H. androsaemum</i>		57,7	57,8	53,3	47,6
2 CHS <i>H. androsaemum</i>			98,5	72,6	58,5
3 CHS <i>H. perforatum</i>				72,2	59,1
4 VPS <i>Humulus lupulus</i>					55,6
5 VPS <i>Psilotum nudum</i>					

Mit Hilfe von degenerierten Primern für hoch konservierte Bereiche können neue PKS III Fragmente isoliert werden. Für BUS ist eine Identität zwischen 50 - 80 % zur CHS und BPS auf Aminosäure-Ebene zu erwarten. Für die Amplifikation der gesuchten BUS-cDNAs wurden vier strangabwärts (pd0, pd1, pd2, und pd5) und drei strangaufwärts (pd3, pd4 und pd6) gerichtete Primer entworfen. Sie leiteten sich von konservierten Regionen der bekannten

PKS-Sequenzen ab (Abb. 4.4). Standen für eine Basenposition im Primer alle vier Nukleotide zur Auswahl, wurde Inosin verwendet. Inosin besitzt die Eigenschaft, mit allen vier Nukleotiden stabile Wasserstoffbrücken zu bilden (Kwok et al., 1997). Ein mit Inosin modifizierter Primer steigert die sonst durch den Einbau von A, T, G oder C verringerte Wahrscheinlichkeit der Hybridisierung mit dem Zielmolekül. Theoretisch sollten durch Verwenden dieser Primer in der PCR bei niedrigen Anlagerungs-Temperaturen (40 - 55 °C) unterschiedliche PKS-Fragmente mit höheren oder niedrigeren Homologien zu bekannten PKS amplifiziert werden. Es sollten Fragmente sowohl der BUS als auch der CHS und BPS auftreten.

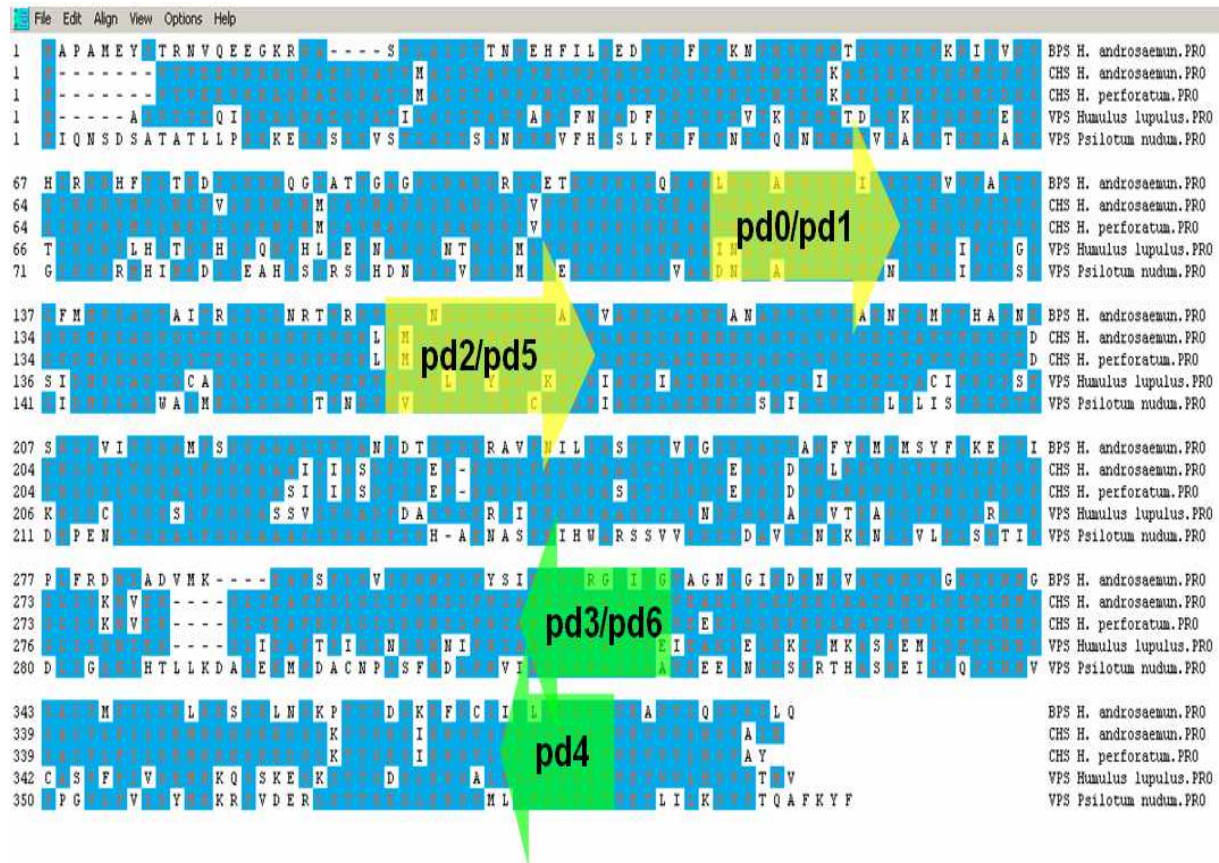


Abb. 4.4: Positionen der erzeugten degenerierten Primer

4.4 Amplifikation von BUS-Fragmenten aus *H. calycinum* mit degenerierten Primern

Für die Amplifikation von mutmaßlichen BUS-Fragmenten aus *H. calycinum* diente als *sense*-Primer einer der degenerierten Primer in Kombination mit einem zweiten degenerierten *reverse*-Primer oder mit dem RACE_{long} bzw. RACE_{short}-Primer (Tab. 4.2, Abb. 4.5, 4.6 und 4.7). Die erwartete Größe der Produkte lag zwischen 450 und 1100 bp. Als Matrize dienten cDNAs, die in der reversen Transkription synthetisiert wurden.

Tab. 4.2: Mögliche Kombinationen von degenerierten und RACE-Primern

Primer	pd3	pd6	pd4	RACE _{long/Short}
pd0	X	X	X	X
pd1	X	X	X	X
pd2	X	X	X	X
pd5	X	X	X	X
RACE _{long/Short}	X	X	X	-

-: Kombination nicht möglich

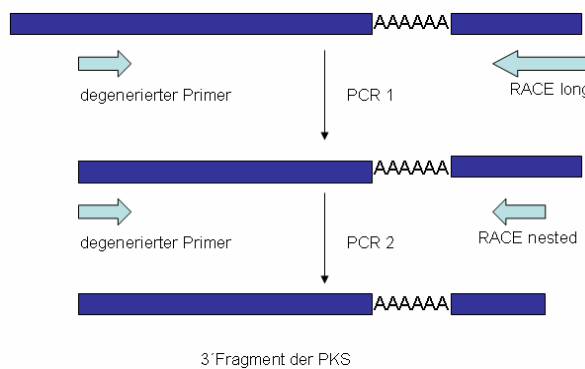


Abb. 4.5: Schema der PCR mit RACE- und degenerierten sense-Primern

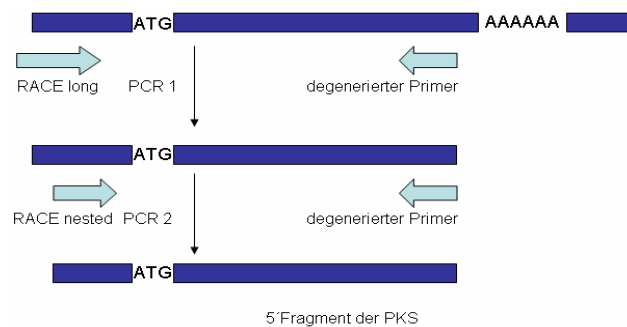


Abb. 4.6: Schema der PCR mit RACE- und degenerierten reverse-Primern

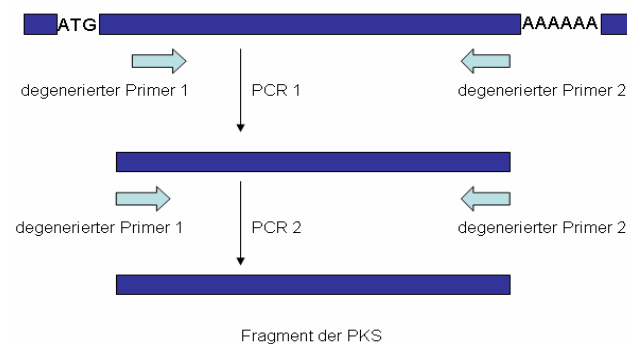


Abb. 4.7: Schema der PCR mit degenerierten sense- und degenerierten reverse-Primern

Obwohl die durchschnittliche Schmelztemperatur der Primer zwischen 55 und 66 °C lag, erfolgte die PCR bei einer Anlagerungs-Temperatur von 45 °C (Tab. 4.3), die Zeit der Extension betrug 1,5 min. Alternativ wurde eine Touchdown-PCR (Tab. 4.4) durchgeführt, wobei die Anlagerungs-Temperatur von 55 °C schrittweise (in jedem Zyklus um 1 °C) auf 45 °C reduziert wurde. Die *Taq*-Polymerase wurde nach der anfänglichen zweiminütigen Denaturierung direkt vor dem ersten Zyklus zugegeben (Hot Start-PCR), um eine noch größere Selektivität der PCR zu erreichen. Um sicherzustellen, dass tatsächlich der gewünschte Bereich der PKS amplifiziert wurde und auch wegen der geringen Ausbeute der ersten PCR, wurde mit dem weiter innen liegenden Primer RACE_{nested} und dem PCR-Produkt eine geschachtelte (nested) PCR durchgeführt.

Tab. 4.3: Standard-PCR-Programm

Schritt-Nr.:	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus
1	Start-Denaturierung	94	120	1x
2	Pause	70	0	
3	Denaturierung	94	30	25-30x
4	Annealing	45	40	
5	Elongation	72	90	
6	Finale Elongation	72	600	1x
7	Pause	10	0	

Tab. 4.4: Standard Touchdown-PCR-Programm

Schritt-Nr.:	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus	
1	Start-Denaturierung	95	120	1x	
2	Pause	70	0		
3	Denaturierung	94	30	9x	-1,0 °C
4	Annealing	55-45	40		
5	Elongation	72	90		
6	Denaturierung	94	30	19x	
7	Annealing	55	40		
8	Elongation	72	90		
9	Finale Elongation	72	600	1x	
10	Pause	12	0		

4.4.1 Ergebnisse der PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR)

Die PCR wurde nach den Angaben in Tab. 4.5 durchgeführt. Fast alle möglichen Kombinationen waren bei *H. calycinum* erfolgreich. Die gewonnenen cDNA-Fragmente wurden kloniert und sequenziert.

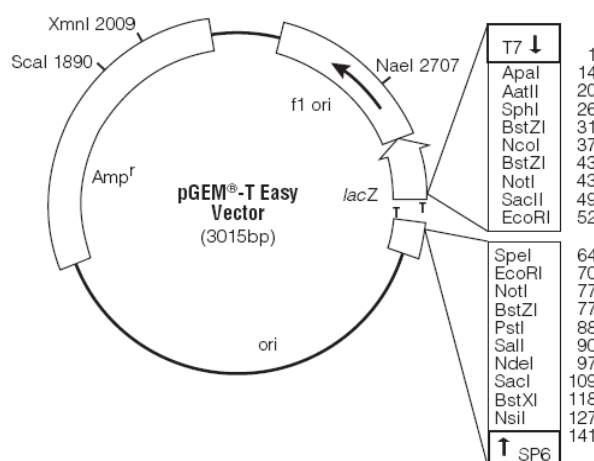
Tab. 4.5: Ergebnisse der PCR mit degenerierten und RACE-Primern

Primer	pd3	pd6	pd4	RACE _{long/Short}
pd0	+	+	-	+
pd1	+	+	-	+
pd2	+	+	+	+
pd5	+	+	+	+
RACE _{long/Short}	+	+	+	x

+: PCR-Produkt, -: kein PCR-Produkt, x: Kombination nicht möglich

4.4.2 Klonierung und Sequenzierung der gewonnenen Fragmente

Die gereinigten, mit *Taq*-DNA-Polymerase gewonnenen Amplifikationsprodukte wurden in den pGEM[®]-T Easy Vektor (Abb. 4.8) kloniert (3.15) und nach Vermehrung und Plasmidisolierung anschließend sequenziert (3.19).

Abb. 4.8: pGEM[®]-T Easy Vektor-Karte und multiple Klonierungsstelle


Für die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde das automatische Sequenzier-System von Applied Biosystems (Modell 377) verwendet. Die erhaltenen Basensequenzen und daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mittels des Softwareprogramms von Lasergene 99 DNA STAR bearbeitet. Für initiale Ähnlichkeitssuchen oder Datenbankvergleich mit bekannten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden die Großdatenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) mit der enthaltenen BLAST Suchoption (Altschul et al., 1997) genutzt (3.19.4).

Dabei konnten vier neue unterschiedliche Fragmente identifiziert werden, die 79 - 90% Identität mit anderen PKS III in der Datenbank aufwiesen und möglicherweise für BUS kodieren.

4.4.3 Sequenz-Analyse der vier gewonnenen cDNA-Fragmente

4.4.3.1 cDNA Fragment 1

Verwendet wurden ein degenerierter Primer (dp1) und ein 1:4 Gemisch aus den beiden universellen RACE_{long} und RACE_{short} Anker-Primern. Das führte zur Amplifikation des cDNA Fragments 1, welches hohe Ähnlichkeit zur CHS aus *H. perforatum* aufwies (Abb. 4.9).

```
>  gi|18308038|gb|AAL67805.1|AF461105.1 chalcone synthase [Hypericum perforatum]
Length=389

Score = 253 bits (647), Expect = 3e-66
Identities = 135/153 (88%), Positives = 147/153 (96%), Gaps = 0/153 (0%)
Frame = +1

Query 1      MMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSMVGQALFgd 180
Sbjct 158    MMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENN+GARVLVVCSEITAVTFRGP++THLDS+VGQALFGD 217


Query 181    gaaaxivgadpdpvLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISK 360
Sbjct 218    GAA+ I+G+DP P +EKPLF+LVSASQTILPDSEGAIDGH+REVGLTFHLLKDVPGGLISK 277

Query 361    NIEKSLVEAFKPIGISDWSLFWIAHPGGIAXL 459
Sbjct 278    NVEKSLTEAFKPLGISDWSLFWIAHPGGPAIL 310
```

Abb. 4.9: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich von cDNA Fragment 1

4.4.3.2 cDNA Fragment 2

Die Kombination von degenerierten Primern dp2 und dp3 führte zur Amplifikation des cDNA Fragments 2, das ebenfalls hohe Homologie zur CHS aus *H. perforatum* zeigte (Abb. 4.10).

```
>  gi|18308038|gb|AAL67805.1|AF461105.1 chalcone synthase [Hypericum perforatum]
Length=389

Score = 211 bits (538), Expect = 1e-53
Identities = 119/148 (80%), Positives = 138/148 (93%), Gaps = 0/148 (0%)
Frame = +1

Query 1      GCVAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAITFRGPSETHMDNLVGGQALFGDGASAI 180
Sbjct 163    GC AGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITA+TFRGP++TH+D+LVGQA+FGDGA++I 222

Query 181    IIGSDPVEVEVERPLFELLSATQTILPDHXHGAIEGHLCEXGLTFHLRKDVPELISKNIKDS 360
Sbjct 223    IIGSDP+PEVE+PLFEL+SA+QTILPD GAI+GH+ E GLTFHL KDVPELISKNIKDS 282

Query 361    LKEAFEPLGISDWSIFWIAHPGGXXII 444
Sbjct 283    LTEAFKPLGISDWSLFWIAHPGGPAIL 310
```

Abb. 4.10: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich von cDNA Fragment 2

4.4.3.3 cDNA Fragment 3

Zwei Kombinationen von degenerierten Primern führten zur Amplifikation von cDNA Fragment 3: dp2-dp3 und dp1-dp3. Auch dieses Fragment ähnelt stark der CHS aus *H. perforatum* (Abb. 4.11).


```
>[gi|18308038|gb|AAL67805.1|AF461105_1 chalcone synthase [Hypericum perforatum]
Length=389

Score = 174 bits (440), Expect = 3e-42
Identities = 83/92 (90%), Positives = 91/92 (98%), Gaps = 0/92 (0%)
Frame = +2

Query 2 DTHLDSL VGQALFGDGAAAVIIGSDPVPEVEKPLFELVSAQTILPDSG AIDGHLREVG 181
        DTHLDSL VGQALFGDGAA++IIGSDP+PEVEKPLFELVSA+QTILPDS+GAIDGH+REVG
Sbjct 203 DTHLDSL VGQALFGDGAAASIIIGSDPIPEVEKPLFELVSAQTILPDSGAIDGHIREVG 262

Query 182 LTFHLLKDVPG LISK NIEKSLNEAFKPIG ISD 277
        LTFHLLKDVPG LISK N+EKSL EAFKP+G ISD
Sbjct 263 LTFHLLKDVPG LISK NVEKSLTEAFKPLG ISD 294
```

Abb. 4.11: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich von cDNA Fragment 3

4.4.3.4 cDNA Fragment 4

Zwei Kombinationen von degenerierten Primern führten zur Amplifikation von cDNA Fragment 4: dp0-dp3 und dp2-dp4. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde in der Datenbank als erste mit Resveratrol-Synthase und Stilben-Synthase aus *Vitis vinifera* verglichen (Abb. 4.12).

```
>[gi|85822802|gb|ABC84859.1| resveratrol synthase [Vitis vinifera]
Length=392

Score = 380 bits (975), Expect = 7e-104
Identities = 201/216 (93%), Positives = 208/216 (96%), Gaps = 0/216 (0%)
Frame = +1

Query 1 IMMYQQG CYAGGT VLR AAKDLAENNVGARVLVVCSEITVVTFRGPSXTALDSL VGQALFG 180
        +M+Y QG CYAGGT VLR AKDLAENN GARVLVVCSEITVVTFRGPS ALDSL VGQALFG
Sbjct 157 VMLYHQG CYAGGT VLR TAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPS EDALDSL VGQALFG 216

Query 181 DGSAAVIVGSDPDVSIERPLFQLVSAQT FIPNSXGAIAGNLREVGLTFHLWPNVPTLIS 360
        DGSAAVIVGSDPD+SIERPLFQLVS AQT FIPNS GAIAGNLREVGLTFHLWPNVPTLIS
Sbjct 217 DGSAAVIVGSDPDISIERPLFQLVSAQT FIPNSAGAIAGNLREVGLTFHLWPNVPTLIS 276

Query 361 ENIEKCLTQAFDP IGISD WNSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRHVLSEYGN 540
        EN+EKCLTQAFDP+GISD WNSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNL+KKKLEATRHVLSEYGN
Sbjct 277 ENVEKCLTQAFDPLGISD WNSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLDKKKLEATRHVLSEYGN 336

Query 541 MSSACVLFILDEMRRKSLKGEKATTGEGLDWGVXFG 648
        MSSACVLFILDEMRRKSLKGE+ATTGEGLDWGV FG
Sbjct 337 MSSACVLFILDEMRRKSLKGERATTGEGLDWGVLF 372

>[gi|116271893|gb|ABJ97068.1| stilbene synthase [Vitis vinifera]
Length=392

Score = 377 bits (967), Expect = 6e-103
Identities = 201/216 (93%), Positives = 208/216 (96%), Gaps = 0/216 (0%)
Frame = +1

Query 1 IMMYQQG CYAGGT VLR AAKDLAENNVGARVLVVCSEITVVTFRGPSXTALDSL VGQALFG 180
        +M+Y QG CYAGGT VLR AKDLAENN GARVLVVCSEITVVTFRGPS ALDSL VGQALFG
Sbjct 157 VMLYHQG CYAGGT VLR TAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPS EDALDSL VGQALFG 216

Query 181 DGSAAVIVGSDPDVSIERPLFQLVSAQT FIPNSXGAIAGNLREVGLTFHLWPNVPTLIS 360
        DGSAAVIVGSDPD+SIERPLFQLVS AQT FIPNS GAIAGNLREVGLTFHLWPNVPTLIS
Sbjct 217 DGSAAVIVGSDPDISIERPLFQLVSAQT FIPNSAGAIAGNLREVGLTFHLWPNVPTLIS 276

Query 361 ENIEKCLTQAFDP IGISD WNSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRHVLSEYGN 540
        ENIEKCLT+AFDP+GISD WNSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRHVLSEYGN
Sbjct 277 ENIEKCLTQAFDPLGISD WNSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRHVLSEYGN 336

Query 541 MSSACVLFILDEMRRKSLKGEKATTGEGLDWGVXFG 648
        MSSACVLFILDEMRRKSLKGE+ATTGEGLDWGV FG
Sbjct 337 MSSACVLFILDEMRRKSLKGERATTGEGLDWGVLF 372
```

Abb. 4.12: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich von cDNA-Fragment 4

4.4.4 Fragment-Vergleich der abgeleiteten Aminosäuren-Sequenzen

Mit Hilfe des Softwareprogramms MegAlign von Lasergene 99 DNA STAR (3.19.4) wurden die Fragmente auf Aminosäure-Ebene mit ausgewählten PKS III (BPS und CHS aus *H. androsaemum*, CHS aus *H. perforatum*, VPS aus *Humulus lupulus* sowie *Psilotum nudum*) verglichen (Abb. 4.13 und Tab. 4.6).

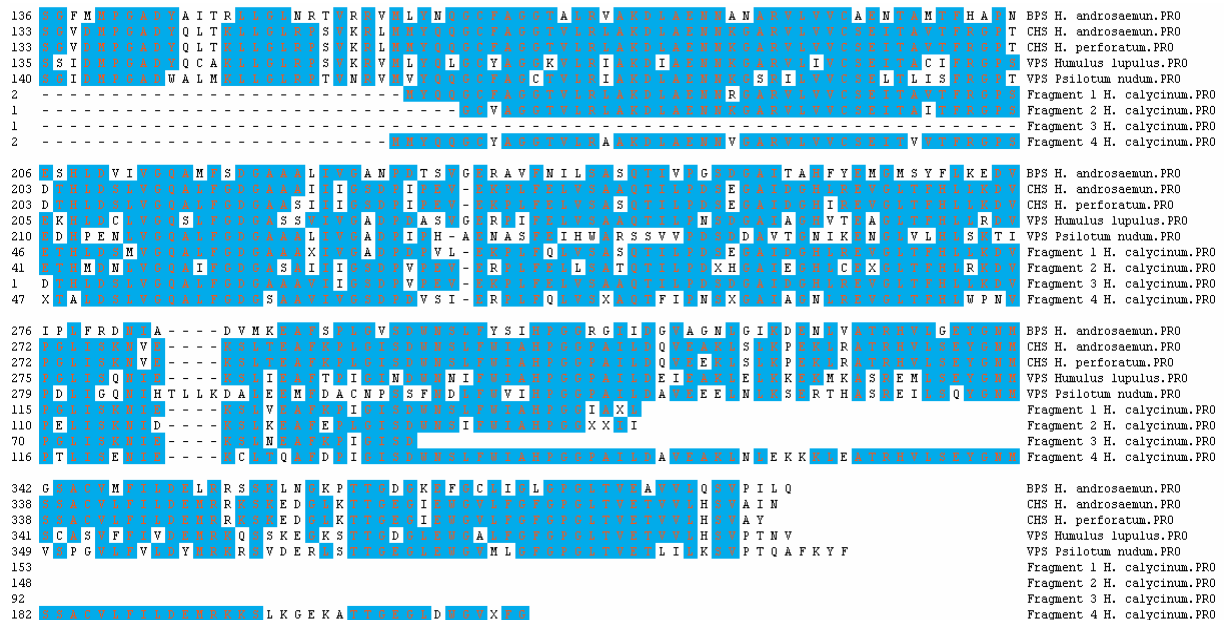


Abb. 4.13: Vergleich der neuen Aminosäuren-Sequenzen (136 AA → C-terminal) mit fünf ausgewählten PKS III

Tab. 4.6: Prozentuale Identität der ausgewählten PKS und neu klonierten Fragmente auf Aminosäure-Ebene

Identität [%]	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 BPS <i>H. androsaemum</i>		57,7	57,8	53,3	47,6	58,2	56,1	46,7	51,9
2 CHS <i>H. androsaemum</i>			98,5	72,6	58,5	88,9	81,8	93,5	76,9
3 CHS <i>H. perforatum</i>				72,2	59,1	88,2	80,4	90,2	75,0
4 VPS <i>Humulus lupulus</i>					55,6	73,2	69,6	71,7	67,6
5 VPS <i>Psilotum nudum</i>						55,6	53,4	45,7	53,7
6 Fragment 1 <i>H. c.</i>							77,0	87,0	78,4
7 Fragment 2 <i>H. c.</i>								78,3	68,9
8 Fragment 3 <i>H. c.</i>									71,7
9 Fragment 4 <i>H. c.</i>									

Der Vergleich von Typ III PKS aus der Datenbank mit den vier neu klonierten cDNA-Fragmenten ergab eine Homologie auf Aminosäure-Ebene von 46 bis 89 %. Dabei unterschieden sich die vier neuen Fragmente deutlich voneinander.

Aus *H. calycinum* und *H. perforatum* waren CHS und BPS bereits früher kloniert und heterolog exprimiert worden (Klingauf, 2004). Allerdings war die rekombinante BPS aus *H.*

perforatum inaktiv. Die vier neuen Fragmente wurden mit CHS und BPS aus *H. calycinum* und *H. perforatum* auf Aminosäure-Ebene verglichen (Abb. 4.14).



Abb. 4.14: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von BPS und CHS aus *H. calycinum* und *H. perforatum* (Klingauf, 2004) mit den neu klonierten cDNA-Fragmenten aus *H. calycinum*

Zusammenfassend lagen die Identitäten mit CHS zwischen 75 - 90 % und mit BPS zwischen 43 - 56 % (Tab. 4.7).

Tab. 4.7: Prozentuale Identität von CHS und BPS aus *H. perforatum* und *H. calycinum* (Klingauf, 2004) mit den neu klonierten Fragmenten aus *H. calycinum* auf Aminosäure-Ebene

Identität [%]	1	2	3	4	5	6	7	8
1 CHS <i>H. perforatum</i>		98,7	56,6	55,8	86,3	79,1	89,1	74,5
2 CHS <i>H. calycinum</i>			56,7	55,9	86,3	78,4	88,0	74,1
3 BPS <i>H. perforatum</i>				92,0	55,6	54,1	43,5	50,5
4 BPS <i>H. calycinum</i>					54,9	53,4	42,4	50,0
5 Fragment 1 <i>H. c.</i>						77,0	87,0	78,4
6 Fragment 2 <i>H. c.</i>							78,3	68,9
7 Fragment 3 <i>H. c.</i>								71,1
8 Fragment 4 <i>H. c.</i>								

Für jedes neue cDNA-Fragment aus *H. calycinum* wurden genspezifische sense- und reverse-Primer (GSP) entworfen, um eine geschachtelte (nested) 3' RACE- und 5' RACE-PCR durchzuführen (3.9.3).

4.5 Amplifikation der fehlenden 5' und 3'-cDNA-Enden

4.5.1 3'-RACE-PCR

Mittels 3' RACE-PCR (Abb. 4.15) wurden die cDNA Fragmente 1, 2 und 3 stromabwärts vervollständigt.

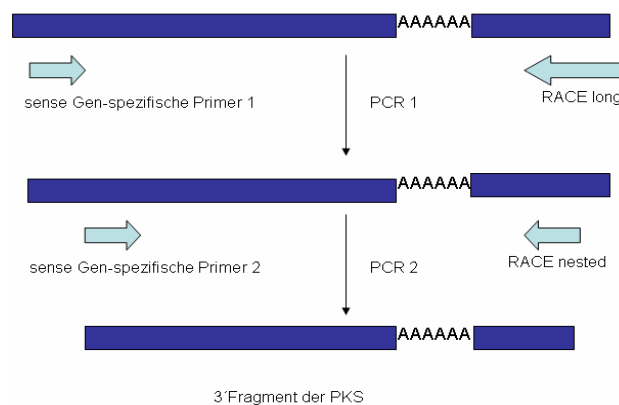



Abb. 4.15: Schema der 3' RACE-PCR mit RACE- und genspezifischen sense-Primern

Trotz wiederholter mRNA-Isolierung, Optimierung der Bedingungen der RT-3'-RACE-PCR und Austausch der reversen Transkriptase war es nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit cDNA-Fragment 4 stromabwärts zu vervollständigen. Die 3'-komplettierten Fragmente 1-3 sind in Abb. 4.16 - 4.18 gezeigt. Alle drei Sequenzen zeigen höchste Ähnlichkeit zur CHS aus *H. perforatum*.

3'-cDNA-Fragment 1

5'-ATTATGATGTATCAGCAGGGGTGTTTCGCCGGCGGGCACCGTCCTCCGCCTTGC
 CAAGGATCTCGCTGAGAACAACCGCGGTGCCCCGCGTCCTCGTAGTTTGCTCCGAG
 ATCACGGCTGTACCTTCCGWGGCCCCCTCCGARACCCACCTCGACTYCATGGTCG
 GTCAGGCCCTCTTTGGGGACGGAGCTGCCGCGATCATCGTGGGGGGCCGACCCGGA
 CCCGGTCCTCGAGAAACCCCTCTTCCARCTCGTCTCCGCATCGCAGACCATCCTCC
 CGGACTCGGAAGGKGCCATTGACGGCCACCTGAGGGAGGTGGGMCTCACCTTCC
 ACCTGCTAAAGGACGTGCCAGGGGCTCATCTCGAAAAACATAGAGAAGAGTCTGG
 TGGAGGCGTTCAAGCCCATAGGGATCAGCGACTGGAACCTCCCTCTTCTGGATHGC
 CCACCCCGGCGGAATCGCYATCCTGGACCAGGTTGAAGCCAAGCTCGCCCTCAA
 GGAGGAGAAGCTGAGGTCCACCCGACAAGTGCTCAGCGGTTACGGGAACATGTC
 GAGCGCCTGCGTGCTGTTTATACTTGATGAGATGAGGAACAAGTCCGTCGAGGAA
 GGGAAGGCCACCACCGGAGAGGGGGCTCGAGTGGGGCGTCCTCTTAGGGTTCCG
 ACCCGGCCTCACCGTCGAGACCGTCGTCCTCCACAGTCTTCCCACCCACCAGGCC
 GCCGCCTAGATAAACAATTTCTCTCTTCTTCTTCTTCTTTTTTGTCAATCAAT
 CTTGCTTGGAACACTACATCGTGTGTGGTATATTTATTTAATTATAAAATGGGATA
 TTTTTCACCATTAATATTTAAAAACGTTATGTGGCCTTGTTTTCCAATATTAATTAT
 TCGTCGTGCATATTTGTGGGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

> [gi|18308038|qb|AAL67805.1|AF461105_1](#) chalcone synthase [Hypericum perforatum]
 Length=389

Score = 377 bits (968), Expect = 9e-103
 Identities = 199/231 (86%), Positives = 217/231 (93%), Gaps = 0/231 (0%)
 Frame = +1

Query	1	IMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDMVGQALFg	180
		+MMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENN+GARVLVVCSEITAVTFRGP++THLD +VGQALFG	
Sbjct	157	IMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPTDTHLDSL VGQALFG	216
Query	181	dgaaiivgadpdpVLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLIS	360
		DGAA+II+G+DP P +EKPLF+LVASQTILPDSEGAIDGH+REVGLTFHLLKDVPGLIS	
Sbjct	217	DGAASIIIGSDPIPEVEKPLFELVSASQTILPDSEGAIDGHIREVGLTFHLLKDVPGLIS	276
Query	361	KNIEKSLVEAFKPIGISDWNLSFWIAHPGGIAILDQVEAKLALKEEKLSTRQVLSGYGN	540
		KN+EKSL EAFKP+GISDWNLSFWIAHPGG AILDQVE KL+LK EKLR+TR VLS YGN	
Sbjct	277	KNVEKSLTEAFKPLGISDWNLSFWIAHPGGPAILDQVEEKLKPEKLRAVRHVLSEYGN	336
Query	541	MSSACVLFILDEMRNKSVEEGKATTGEGLEWGVLLGFGPGLTVETVVLHSL	693
		MSSACVLFILDEMR KS E+G TTGEG+EWGVL GFGPGLTVETVVLHS+	
Sbjct	337	MSSACVLFILDEMRKSKEDGLKTTGEGIEWGVLLGFGPGLTVETVVLHSLV	387

Abb. 4.16: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des 3'-cDNA-Fragments 1

3'-cDNA-Fragment 2

5'-GGGTGTGTGGCGGGGGGCACGGTCCTTAGGTTAGCCAAGGACTTAGCCGAGA
 ACAACAAAGGTGCTCGTGTCTAGTTGTGTGCTCAGAGATCACTGCTATTACTTTT
 CGAGGCCCAAGTGAAACCCATATGGACAATCTTGTGGGTCAAGCCATATTTGGAG
 ATGGAGCAAGTGCAATCATAATTGGTTCAGATCCTGTCCCTGAGGTGGAGAGGCC
 TTTATTTGAGCTGCTTTCTGCCACCCAGACAATTCTTCCCGATAGTCACGGTGCGA
 TTGAAGGACACCTCTGTGAAGTTGGACTAACATTCCATCTTCGTAAGGATGTTCC
 GGAGCTTATCTCGAAGAATATTGACAAGAGTTTGAAGGAGGCATTCGAGCCGCTA
 GGAATTTCTGATTGGAATTCAATTTTCTGGATAGCCCACCCCGGCGGCTCCGGCA
 TAATNCTAAACAAAATTGAGCAGAAATTAAGCCTGGAGCCCCAAAAAACTCCGAG
 CTACAAGACATGTGTTGAGCGAATATGGGAACATGTCTGAGTGCCTGTCTTATT
 CATACTTGATGAGATGAGGAAAGCGACGAGTAAAGATGGACATAGCACCACAGG
 AGAAGGGCTAGAATGGGGTGTGCTCTTCGGTTTTTGGACCTGGTCTGACGGTCGAG
 ACGGTGGCTCTACGCAGTYTCAATATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

>[gi|18308038|gb|AAL67805.1|AF461105_1](#) chalcone synthase [Hypericum perforatum]
 Length=389

Score = 374 bits (961), Expect = 3e-102
 Identities = 181/225 (80%), Positives = 209/225 (92%), Gaps = 1/225 (0%)
 Frame = +1

Query	1	GCVAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITAITFRGPSETHMDNLVQGAI	180
		GC AGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITA+TFRGP++TH+D+LVGQA+FGDGA++I	
Sbjct	163	GCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITAVTFRGPTDTHLDSLVGQALFGDGAASI	222
Query	181	IIGSDPVPEVERPLFELLSATQTILPDSHGAIEGHLCEVGLTFHLRKDVPELISKNIDKS	360
		IIGSDP+PEVE+PLFEL+SA+QTILPDS GAI+GH+ EVGLTFHL KDVP LISKN++KS	
Sbjct	223	IIGSDPIPEVEKPLFELVSASQTILPDSEGAIDGHIREVGLTFHLLKDVPGELISKNVEKS	282
Query	361	LKEAFEPLGISDWNISFWIAHPGGSGIXLNKIEQKLSLEPKLRATRHLSEYGNMSSAS	540
		L EAF+PLGISDWNISFWIAHPGG I L+++E+KLSL+P+KLRATRHLSEYGNMSSA	
Sbjct	283	LTEAFKPLGISDWNISFWIAHPGGPAI-LDQVEEKLSLKPEKLRATRHLSEYGNMSSAC	341
Query	541	VLFIIDEMRKATSKDGHSTTGEGLEWGVLFSGFGPGLTVETVALRS	675
		VLFIIDEMR+ + +DG TTGEG+EWGVLFSGFGPGLTVETV L S	
Sbjct	342	VLFIIDEMRRKSKEDGLKTTGEGIEWGVLFSGFGPGLTVETVVLHS	386

Abb. 4.17: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des 3'-cDNA-Fragments 2

3'-cDNA-Fragment 3

5'-CAACAAGGGTGCACGTGTTCTTGTGTGTGCTCTGAGATCACCGCGGTCACCTT
 CCGCGGGCCTAGTGACACCCACCTTGACAGTCTTGTGGGTCAAGCCTTGTGTTGGT
 GACGGTGCAGCGGCCGTCATCATTGGTTCGGATCCAGTGCCCGAAGTCGAGAAGC
 CCTTGTGTTGAATTGGTGTGTCAGCAGCACAAACCATTCTTCCCGACAGTGATGGGGC
 TATTGACGGGCATCTCCGTGAAGTAGGGCTTACATTTACCTTCTCAAGGACGTTCC
 CCGGGCTTATTTCCAAGAATATCGAAAAGAGCCTTAACGAGGCCTTCAAGCCTAT
 AGGCATTTTCGGACTGGAAGTCTGCTCTTCTGGATTGCCCCACCCCGGCGGCCCCGGC
 ATAATCGACCAGGTAGAGGCCAAGTTGGGCCTCAAGCCCCGAGAAGCTACGGGGCC
 ACAAGGCGTGTCTGTCCGAGTACGGTAACATGTCCAGTGCCTGTGTGCTATTCA
 TCTTGGATGAGATGAGGAGGAAGTCCAAGGAAGATGGGCTTAAGACCACAGGAG
 AAGGGATCCAGTGGGGAGTGCTTTTTGGATTTGGGCCTGGGCTTACTGTTGAGAC
 CGTGGTCTTTCACAGTGTGCGCCACTAACTAAGATGTGCTCGAGTTTATTTTGTGTC
 ATCTACTCTTGTCTCCCTGTAATATTTTCACTACTTTTACCTCTTGGTTGTTGGAC
 TCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

>[gi|18308038|gb|AA167805.1|AF461105_1](#) chalcone synthase [*Hypericum perforatum*]
 Length=389

Score = 395 bits (1014), Expect = 3e-108
 Identities = 192/208 (92%), Positives = 203/208 (97%), Gaps = 0/208 (0%)
 Frame = +2

```
Query 2  NKGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSL VGQALFGDGAAAVIIGSDPVPEVEKPLFELV 181
          NKGARVLVVCSEITAVTFRGP+DTHLDSL VGQALFGDGAA++IIGSDP+PEVEKPLFELV
Sbjct 181 NKGARVLVVCSEITAVTFRGPTDTHLDSL VGQALFGDGAAIIIGSDPIPEVEKPLFELV 240

Query 182 SAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDV PGLISK NIEKSLNEAFKPIGISDWN SLFW 361
          SA+QTILPDS+GAIDGH+REVGLTFHLLKDV PGLISK N+EKSL EAFKP+GISDWN SLFW
Sbjct 241 SASQTILPDSEGAIDGHIREVGLTFHLLKDV PGLISK NVEKSLTEAFKPLGISDWN SLFW 300

Query 362 IAHPGGPGIIDQVEAKLGLKPEKLRATRRLVSEYGNMSSACVLFILDEMRRRSKEDGLKT 541
          IAHPGGP I+DQVE KL LKPEKLRATR VLSEYGNMSSACVLFILDEMRRRSKEDGLKT
Sbjct 301 IAHPGGPAILDQVEEKLKPEKLRATRHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRRSKEDGLKT 360

Query 542 TGEGIQWGVLF GFGPGLTVETVVLH SVA 625
          TGEGI+WGVLF GFGPGLTVETVVLH SVA
Sbjct 361 TGEGIEWGVLF GFGPGLTVETVVLH SVA 388
```

Abb. 4.18: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des 3'-cDNA-Fragments 3

4.5.2 5'-RACE-PCR

Die 5'-RACE-PCR (3.9.1) wurde nicht mit dem cDNA-Fragment 3 durchgeführt, da es im Vergleich zu den anderen Sequenzen eine auffallend hohe Ähnlichkeit mit der CHS aus *H. perforatum* aufwies, die bei 92 % lag (Abb. 4.18). Erwartet für BUS war eine Identität mit CHS von weniger als 90 %. Fragment 3 gehört mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer cDNA, die für eine CHS-Isoform kodiert. Die 5'-RACE-PCR (Abb. 4.19) wurde dann für die cDNA-Fragmente 1, 2 und 4 durchgeführt.

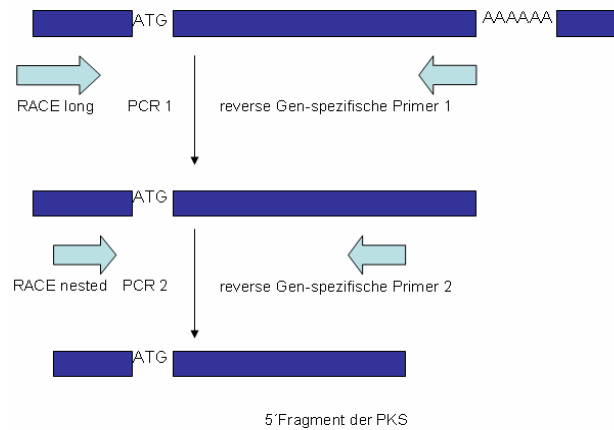


Abb. 4.19: Schema der 5'-RACE-PCR mit RACE- und reversen genspezifischen Primern

Trotz neuer RNA-Isolierung und mehrfacher Änderung der RT-5'-RACE-PCR Bedingungen (3.9.4) war es nicht möglich, die cDNA-Fragmente 1, 2 und 4 stromaufwärts zu vervollständigen.

Bei der Bearbeitung von DNA-Matrizen mit GC-reichen Sequenzen oder Sekundärstrukturen empfiehlt sich unter Umständen der Zusatz von PCR-Additiven, wie z.B. DMSO. PCR-Additive verändern das Schmelzverhalten der DNA und können so eine verbesserte Amplifikation von DNA-Abschnitten ermöglichen. Es wurden DMSO-Lösungen zugegeben und verschiedene Polymerasen eingesetzt. Trotzdem konnten komplette Sequenzen für die Fragmente 1, 2 und 4 nicht kloniert werden. Ein Grund könnte sein, dass Sekundärstrukturen in der mRNA vorlagen, die die reverse Transkriptase behinderten. So kann die RT-Reaktion nicht vollständig ablaufen und der Anker-Primer bindet stromabwärts vom tatsächlichen 5'-Ende. Oder der Primer bindet unspezifisch an eine interne Sequenz und erschwert dadurch die RT-Reaktion. Als dritte Möglichkeit käme ein partieller Abbau der mRNA durch Nukleasen in Frage. Dadurch wird die Matrize für die reverse Transkriptase verkürzt und das 5'-Ende kann nicht komplett in cDNA umgeschrieben werden.

Aus diesem Grund wurde in einem neuen Ansatz die thermostabile PrimeScript™ Reverse Transcriptase der Firma TAKARA BIO INC eingesetzt. Dieses Enzym hat seine maximale Polymeraseaktivität bei höheren Temperaturen (bis 60 °C) und ist deshalb in der Lage, bei Sekundärstrukturen effektiver zu transkribieren. Die Synthese erfolgte wie in 3.8.1.2 beschrieben. Außer dem oligo-dT Primer wurde für eine stringente RT-Reaktion ein genspezifischer Primer eingesetzt. Die gewonnene cDNA wurde anschließend als Matrize in die PCR eingebracht, jedoch konnten keine neuen Sequenzinformationen gewonnen werden.

Eine weitere Möglichkeit, die vollständigen cDNAs 1, 2 und 4 zu amplifizieren, schien eine der RACE-PCR verwandte Methode zu sein. Mit Hilfe der terminalen Transferase (TdT) wurde eine 5'-cDNA synthetisiert (3.8.2). Das Enzym TdT addiert an das 5'-Ende einen oligo-dC-Rest, der eine Bindungsstelle für einen Ankerprimer darstellt. In der PCR-Reaktion wurde statt des RACE_{long/short}-Primers ein AUAP-Primer und für die geschachtelte PCR ein AAP-Primer verwendet. Auch diese Methode blieb ohne Erfolg und führte nicht zu den erwünschten vollständigen cDNAs 1, 2, und 4. Lediglich cDNA-Fragment 1 wurde stromaufwärts kurz verlängert (Abb. 4.20).

cDNA-Fragment 1

5'-TACCCCGACTATTACTTCCGCATTACCAACAGCGAGCACATGACCGACCTCAA
 AGAAAAGTTCAAGCGCATGTGCGACAAGTCGTACATTAAGAAGCGGTACATGCA
 CCTGACGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCCTAAGATGTGCGASTACTGGTCGCCG
 WMYCTCGACGCCCCGGCAGGACATCGTTCGTGGTGGAGATCCCCAAGCTCGGGAAAG
 GAGGCGGCCGTGAAGGCGATCAAGGAGTGGGGSCAGCCCAAGTCCAAGATCACT
 CACCTCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCCGGCGCCGACGTTTCGATT
 ATGATGTATCAGCAGGGGTGTTTCGCCGGCGGCACCGTCCTCCGCCTTGCCAAGG
 ATCTCGCTGAGAACAACCGCGGTGCCCCGCGTCCTCGTAGTTTGGCTCCGAGATCAC
 GGCTGTCACCTTCCGAGGCCCCCTCCGAGACCCACCTCGACTCCATGGTCGGTCAG
 GCCCTCTTTGGGGACGGAGCTGCCGCGATCATCGTGGGGGGCCGACCCGGACCCGG
 TCCTCGAGAAACCCCTCTTCCAGCTCGTCTCCGCATCGCAGACCATCCTCCCGGAC
 TCGGAAGGGGCCATTGACGGCCACCTGAGGGAGGTGGGCCTCACCTTCCACCTGC
 TAAAGGACGTGCCAGGGCTCATCTCTAAAAACATAGAGAAGAGTTTGGTGGAGG
 CGTTCAAGCCCATAGGGATCAGCGACTGGAACCTCCTTCTTGGATCGCCCCACCC
 CGGCGGAATCGCCATCCTGGACCAGGTTGAAGCCAAGCTCGCCCTCAAGGAGGA
 GAAGCTGAGGTCCACCCGACAAGTGCTCAGCGGTTACGGGAACATGTTCGAGCGC
 CTGCGTGCTGTTTATACTTGATGAGATGAGGAACAAGTCCGTCGAGGAAGGGAA
 GGCCACCACCGGAGAGGGGCTCGAGTGGGGGCGTCCTCTTAGGGTTTCGGACCCGG
 CCTCACCGTCGAGACCGTCGTCCTCCACAGTCTTCCCACCCACCAGGCCGCCGCC
 TAGATAAACAATTTCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTTTTTGTCAATCAATCTTGCTT
 GGAACACTACATCGTGTGTGGTATATTTATTTAATTATAAAATGGGATATTTTTCA
 CCATTAATATTTAAAAACGTTATGTGGCCTTGTTTTTCCAATATTAATTATTCGTCG
 TGCATATTTGTGGGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

>[gi|18308038|gb|AAL67805.1|AF461105_1](#) chalcone synthase [*Hypericum perforatum*]
 Length=389

Score = 379 bits (973), Expect(2) = 2e-156
 Identities = 200/231 (86%), Positives = 218/231 (94%), Gaps = 0/231 (0%)
 Frame = +3

Query	324	IMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSMVGQALFg	503
		+MMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENN+GARVLVVCSEITAVTFRGP++THLDS+VGQALFG	
Sbjct	157	LMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPTDTHLDSLVGQALFG	216
Query	504	dgaaiiivgadpdpVLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPLIS	683
		DGAA+II+G+DP P +EKPLF+LVVSASQTILPDSEGAIDGH+REVGLTFHLLKDVPLIS	
Sbjct	217	DGAASIIIGSDPIPEVEKPLFELVSASQTILPDSEGAIDGHIREVGLTFHLLKDVPLIS	276
Query	684	KNIEKSLVEAFKPIGSDWNSLFWIAHPGGIAILDQVEAKLALKEEKLSTRQVLSGYGN	863
		KN+EKSL EAFKP+GISDWNLSLFWIAHPGG AILDQVE KL+LK EKLR+TR VLS YGN	
Sbjct	277	KNVEKSLTEAFKPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILDQVEEKLKPEKLRATRHVLSYGN	336
Query	864	MSSACVLFILDEMRNKSVEEGKATTGEGLEWGVLLGFGPGLTVETVVLHSL	1016
		MSSACVLFILDEMR KS E+G TTGEG+EWGVLL GFGPGLTVETVVLHSL	
Sbjct	337	MSSACVLFILDEMRKSKEDGLKTTGEGIEWGVLLGFGPGLTVETVVLHSL	387

Score = 199 bits (507), Expect(2) = 2e-156
 Identities = 94/109 (86%), Positives = 100/109 (91%), Gaps = 0/109 (0%)
 Frame = +1

Query	1	YPDYFRITNSEHMTDLKEKFKRMCDKSYIKKRYMHLTEEILKENPKMCXYWSPXLDARQ	180
		YPDYFRITNSEH +LKEKF+RMCDKS IKKRYM+L EEILKENP MC Y +P LDARQ	
Sbjct	36	YPDYFRITNSEHKAELKEKFQRMCDKSQIKKRYMYLNEEILKENPNMCAYMAPSLDARQ	95
Query	181	DIVVVEIPKLGKEAAVKAIKEWGPQKSKITHLVFCTTSGVDMPGADVRL	327
		DIVVVE+PKLGKEAAVKAIKEWGPQKSKITHLVFCTTSGVDMPGAD +L	
Sbjct	96	DIVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWGPQKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQL	144

Abb. 4.20: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des 5'-verlängerten cDNA-Fragments 1

4.6 Fragment-Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen nach RACE-PCR

Die Fragmente 2 und 4 sowie der C-terminale Bereich von Fragment 1 wurden mit den C-terminalen Abschnitten (136 AA→C-Terminus) von CHS und BPS aus *H. perforatum* und *H. calycinum* auf Aminosäure-Ebene verglichen. Die Identitäten lagen bei 75 - 85 % mit CHS und 51 - 56 % mit BPS (Abb. 4.21 und Tab. 4.8).

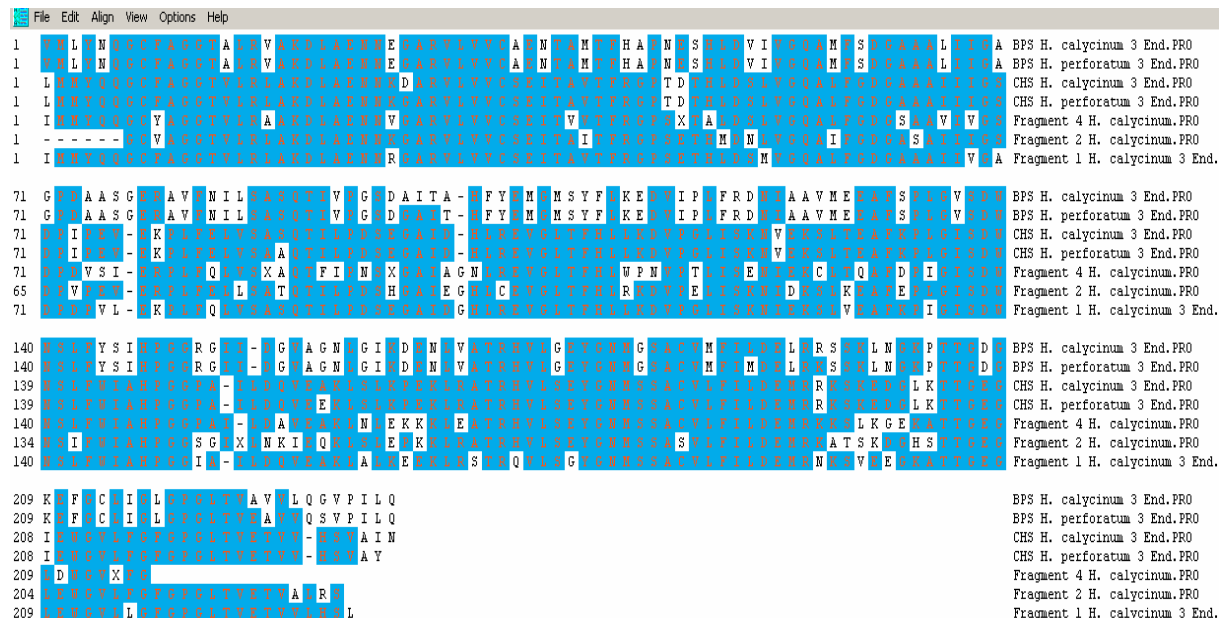


Abb. 4.21: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen der nach RACE-PCR vorliegenden cDNA-Fragmente 1, 2, und 4 aus *H. calycinum* mit den C-terminalen Bereichen von BPS und CHS aus *H. calycinum* und *H. perforatum*

Tab. 4.8: Prozentuale Identität von CHS und BPS aus *H. perforatum* und *H. calycinum* mit den durch RACE-PCR verlängerten cDNA-Fragmenten auf Aminosäure-Ebene

Identität [%]	1	2	3	4	5	6	7
1 BPS <i>H. calycinum</i>		95,7	56,5	56,3	50,0	51,1	55,0
2 BPS <i>H. perforatum</i>			58,2	58,0	50,5	52,0	55,8
3 CHS <i>H. calycinum</i>				98,3	74,1	76,9	84,4
4 CHS <i>H. perforatum</i>					74,5	77,3	84,0
5 Fragment 4 <i>H. c.</i>						68,1	77,3
6 Fragment 2 <i>H. c.</i>							75,1
7 Fragment 1 <i>H. c.</i>							

4.7 TAIL-PCR

Die *Thermal asymmetric interlaced PCR* (TAIL-PCR) bietet die Möglichkeit, die unbekannten flankierenden Sequenzen stromaufwärts bzw. -abwärts eines DNA-Fragments zu identifizieren (3.9.5).

Genomische DNA von *H. calycinum* wurde aus Fruchtknoten von Knospen, aber auch aus Blüten und Früchten isoliert (3.5). Es wurden universelle, degenerierte Primer für den Promotor-Bereich (TD Tata) und die 5'- bzw. 3'-nicht-translatierten Bereiche (Pf1 und Pf2) entworfen. Mit einem der universellen degenerierten Primer (TD Tata, Pf1 und Pf2) und drei geschachtelten genspezifischen reverse-Primern (NP1, NP2 und NP3) wurde die 5'-TAIL-PCR durchgeführt, um die fehlenden 5'-Enden für die cDNA-Fragmente 1, 2 und 4 zu isolieren (Abb. 4.22). Die 3'-TAIL-PCR wurde mit dem universalen degenerierten Primer Pf1 und drei geschachtelten genspezifischen sense-Primern (NP1, NP2 und NP3) für cDNA-Fragment 4 durchgeführt, um das fehlende 3'-Ende doch noch zu erhalten (Abb. 4.23).

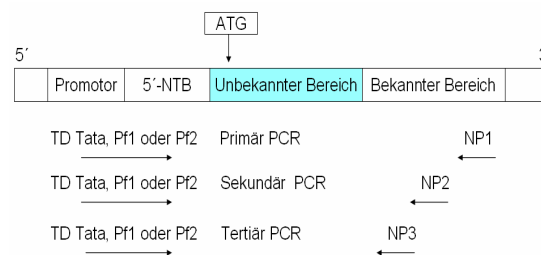


Abb. 4.22: Prinzip der 5'-TAIL-PCR

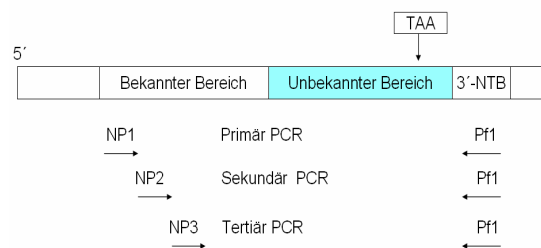


Abb. 4.23: Prinzip der 3'-TAIL-PCR

5'-NTB: 5'-nicht-translatierter Bereich; NP1, NP2 und NP3: Geschachtelte genspezifische Primer; 3'-NTB: 3'-nicht-translatierter Bereich

Die TAIL-PCR wurde nach den Angaben in Tab. 4.9 durchgeführt.

Tab. 4.9: TAIL-PCR-Programm

Reaktion	Zyklenzahl	Programm
Primär	1	95°C 2min
TD Tata, Pf1 oder Pf2 vs. NP1	5	94°C 1min, 62°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	94°C 1min, 25°C 3min, 72°C 2min30sec
	15	94°C 30sec, 62°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	92°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min
Sekundär	20	94°C 30sec, 64°C 1min, 72°C 2min30sec
TD Tata, Pf1 oder Pf2 vs. NP2	1	94°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min
Tertiär	20	94°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
TD Tata, Pf1 oder Pf2 vs. NP3	1	72°C 5min

Auch diese Methode blieb ohne Erfolg und führte nicht zu den erwünschten vollständigen cDNAs 1, 2 und 4.

Da die Fragmente 1, 2 und 4 der CHS aus *H. perforatum* (77 - 89 % Aminosäure-Ebene) ähneln, wurden degenerierte sense-Primer für die N-terminalen Bereiche (ATG-Bereiche, Nukleotid-Ebene) von CHS sowie BPS (Abb. 4. 24) aus den beiden *Hypericum*-Spezies entworfen (5CHSdpsense und 5BPSdpsense).

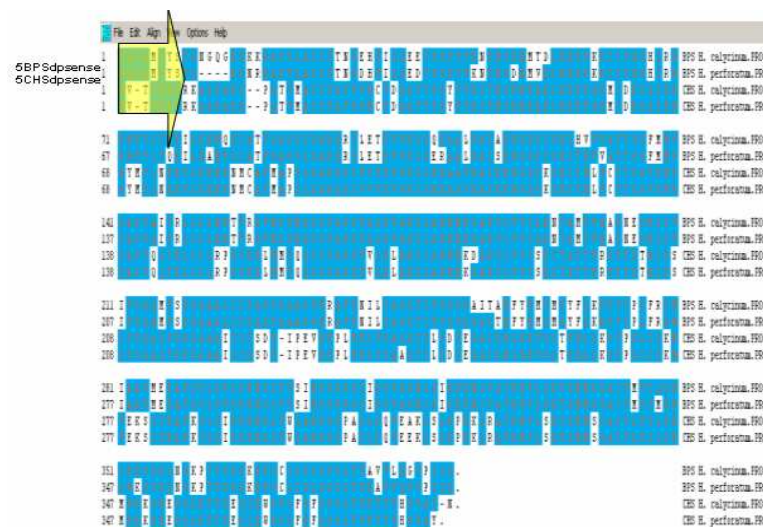


Abb. 4.24: 5CHSdpsense und 5BPSdpsense Primer-Design

Die wie in Abb. 4.25 dargestellten 5'-TAIL-PCR wurde mit den verschiedenen Chargen von genomischer DNA aus *H. calycinum* durchgeführt.

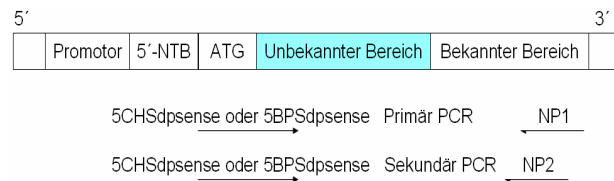


Abb. 4.25: 5'-TAIL-PCR mit 5CHSdpsense / 5BPSdpsense und zwei geschachtelten genspezifischen reverse-Primern (NP1 und NP2)

Trotz der Änderung, wiederholter genomischer DNA-Isolierung, Optimierung der Bedingungen der 5'-TAIL-PCR war es nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit cDNA-Fragment 2 und 4 stromaufwärts zu vervollständigen. Das 5'-Ende von cDNA-Fragment 1 aber wurde mit 5CHSdpsense und zwei reversen genspezifischen Primern (F1REV4 und F1REV3) gewonnen (Abb. 4.26).

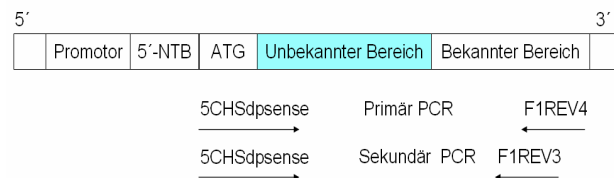


Abb. 4.26: 5'-TAIL-PCR mit den Primern 5CHSdpsense und F1REV3 / F1REV4

Die TAIL-PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Nach dem Vergleich von Nukleotid-Sequenzen durch MegAlign von Lasergene 99 DNA STAR (Abb. 4.27) konnten zwei identische Fragmente (33 5'-Fragment 1 und 32 5'-Fragment 1) als 5'-Ende der cDNA 1 identifiziert werden.

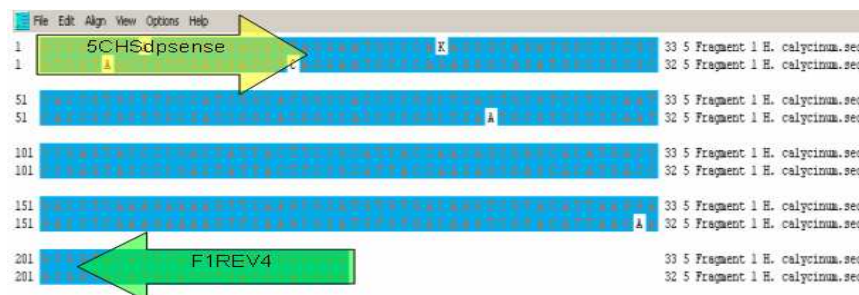


Abb. 4.27: Vergleich der Nukleotid-Sequenzen der beiden 5'-Enden für cDNA-Fragment 1, die durch TAIL-PCR aus *H. calycinum* gewonnen wurden

4.8 Volllänge-cDNA 1 aus *H. calycinum*

Nach dem Gewinnen des 5'-Endes von cDNA-Fragment 1 aus *H. calycinum* wurde der Volllänge-Klon mit der Datenbank NCBI verglichen (Abb. 4.28). Die höchste Identität lag bei 85% mit CHS aus *H. perforatum*.

Volllänge-Klon von cDNA 1

5'-ATGGTWACWGTTGAGGAGGTYAGGAATGCCCAGAGGGCAGATGGCCCCGCCA
 CCGTGCTTGCCATCGGCACGGCCACCCCGGCTCACTGCGTCCTCCAATCCGAGTA
 CCCC GACTATTACTTCCGCATTACCAACAGCGAGCACATGACCGACCTCAAAGAA
 AAGTTCAAGCGCATGTGTGACAAGTCGTACATTAAGAAGCGGTACATGCACCTGA
 CGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCCTAAGATGTGCGACTACTGGTCGCCGACCC
 TCGACGCCCCGGCAGGACATCGTCGTGGTGGAGATCCCCAAGCTCGGGAAGGAGG
 CGGCCGTGAAGGCGATCAAGGAGTGGGGGCAGCCCAAGTCCAAGATCACTCACC
 TCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCGGCGCCGACTACCAGCTCAC
 CAAGCTCCTCGGCCTCCGSCCSCAYKATRATCGMATTATGATGTATCAGCAAGGG
 TGTTTCGCCGGCGGCACCGTCCTCCGCCTTGCCAAGGATCTCGCTGAGAACAACC
 GCGGTGCCCGCGTCCTCGTAGTTTGCTCCGAGATCACGGCTGTCACCTTCCGAGG
 CCCCTCCGAGACCCACCTCGACTCCATGGTCGGTCAGGCCCTCTTTGGGGACGGA
 GCTGCCGCGATCATCGTGGGGGCCGACCCGGACCCGGTCCTCGAGAAACCCCTCT
 TCCAGCTCGTCTCCGCATCGCAGACCATCCTCCCGGACTCGGAAGGGGCCATTGA
 CGGCCACCTGAGGGAGGTGGGCCTCACCTTCCACCTGCTAAAGGACGTGCCAGG
 GCTCATCTCTAAAAACATAGAGAAGAGTTTGGTGGAGGCGTTCAAGCCCATAGG
 GATCAGCGACTGGAACCTCCTTCTTGATCGCCACCCCGGCGGAATCGCCATC
 CTGGACCAGGTTGAAGCCAAGCTCGCCCTCAAGGAGGAGAAGCTGAGGTCCACC
 CGACAAGTGCTCAGCGGTTACGGGAACATGTGCGAGCGCCTGCGTGCTGTTTATAC
 TTGATGAGATGAGGAACAAGTCCGTCGAGGAAGGGAAGGCCACCACCGGAGAGG
 GGCTCGAGTGGGGCGTCTCTTAGGGTTCGGACCCGGCCTCACCGTCGAGACCGT
 CGTCCTCCACAGTCTTCCCACCCACCAGGCCGCCGCTAGATAAACAATTTCTCTCT
 CTTCTTCTTCTTCTTCTTTTTTGTCAATCTTGCTTGGAACACTACATCGTGTG
 TGGTATATTTATTTAATTATAAAAATGGGATATTTTTCACCATTAATATTTAAAAAC
 GTTATGTGGCCTTGTTTTCCAATATTAATTATTCGTGTCATATTTGTGGGTAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

ATGGTWACWGTTGAGGAGGTY: Anlagerungs-Stelle von 5CHSdpsense

GTACATGCACCTGACGGAGGAG: Anlagerungs-Stelle von FIREV4

```
>[q118308038|qb1AAL67805.1|AF461105_1 chalcone synthase [Hypericum perforatum]
Length=389

Score = 645 bits (1664), Expect = 0.0
Identities = 331/387 (85%), Positives = 359/387 (92%), Gaps = 0/387 (0%)
Frame = +1

Query 1 MVTVEVRNAQRADGPATVLAIGTATPAHCVLQSEYPDYYFRITNSEHMTDLKEKFKRMC 180
Sbjct 1 MVTVEEVR AQRA+GPATV+AIGTA P +CV Q+ YPDYYFRITNSEH +LKEKF+RMC 60

Query 181 DKS YIKKRYMHLTEEILKENPKMCDYWSPTLDARQDIVVVEIPKLGKEAAVKAIKEWGQP 360
Sbjct 61 DKS IKKRYM+L EEILKENP MC Y +P+LDARQDIVVVE+PKLGKEAAVKAIKEWGQP 120

Query 361 KSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPHXBRIMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAEN 540
Sbjct 121 KSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRP R+MMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAEN 180

Query 541 NRGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSMVGQALFgdgaaailvgadpdpVLEKPLFQLV 720
Sbjct 181 NKGARVLVVCSEITAVTFRGP++THLDS+VGQALPGDGAA+II+G+DP P +EKPLF+LV 240

Query 721 SASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKSLVEAFKPIGISDWNLSFW 900
Sbjct 241 SASQTILPDSEGAIDGH+REVGLTFHLLKDVPGGLISKN+EKSL EAFKP+GISDWNLSFW 300

Query 901 IAHPGGIAILDQVEAKLALKEEKLSTRQVLSGYGNMSSACVLFILDEMNRKNSVEEGKAT 1080
Sbjct 301 IAHPGG AILDQVE KL+LK EKLR+TR VLS YGNMSSACVLFILDEMNR KS E+G T 360

Query 1081 TGEGLWGVLLGFGPGGLTVETVVLHSL 1161
Sbjct 361 TGEGLWGVLLGFGPGGLTVETVVLHSLV 387
```

Abb. 4.28: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich der Volllänge-cDNA 1 aus *H. calycinum*

Die Volllänge-cDNA 1 aus *H. calycinum* wurde mit BPS und CHS aus *H. perforatum* bzw. *H. calycinum* auf Nukleotid- und Aminosäure-Ebene verglichen. Die Identität von ORF 1 mit CHS und BPS beträgt auf Aminosäure-Ebene 83 % bzw. 55 % (Abb. 4.29 und Tab. 4.10). Auf Nukleotid-Ebene liegt die Identität von ORF 1 mit CHS und BPS bei 68 % bzw. 55 % (Abb. 4.30 und Tab. 4.11).

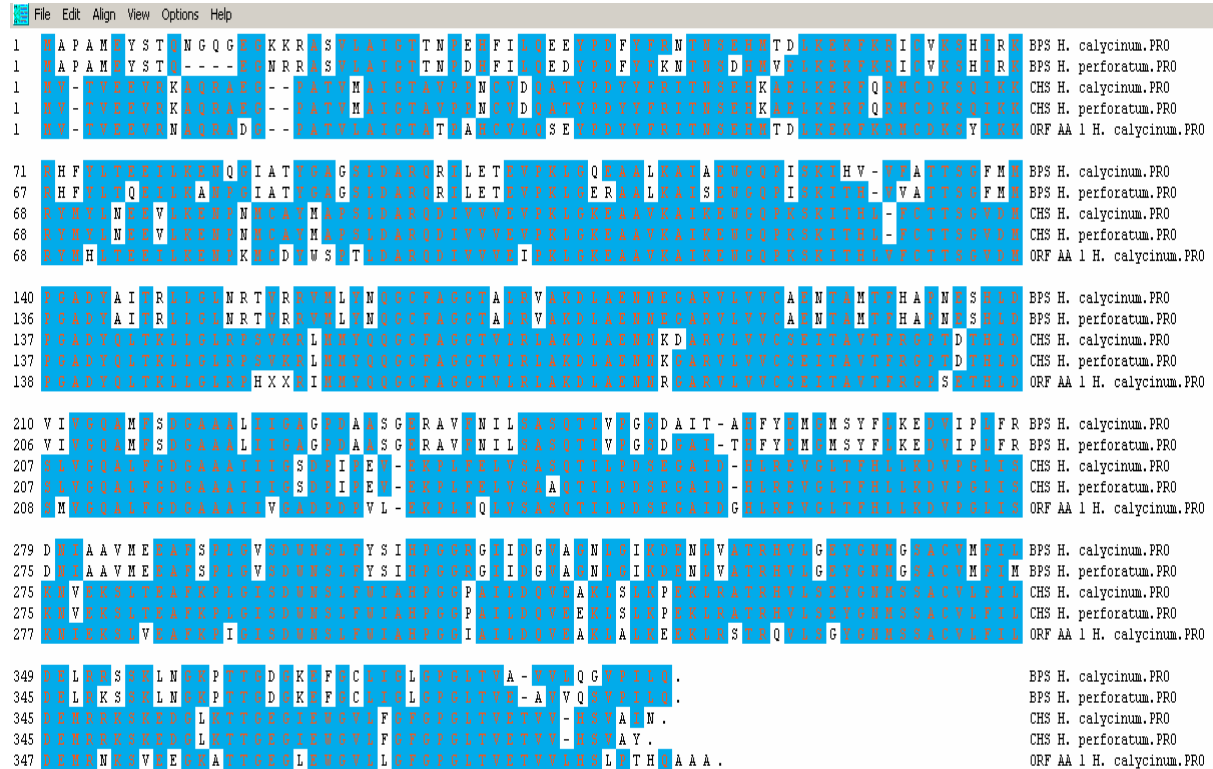


Abb. 4.29: Vergleich auf Aminosäuren-Ebene von ORF 1 aus *H. calycinum* mit BPS und CHS aus *H. perforatum* und *H. calycinum*

Tab. 4.10: Aminosäure-Ebene: Prozentuale Identität von ORF 1 aus *H. calycinum* mit BPS und CHS aus *H. perforatum* und *H. calycinum*

Identität [%]	1	2	3	4	5
1 BPS <i>H. calycinum</i>		92,0	55,9	55,8	55,5
2 BPS <i>H. perforatum</i>			56,7	56,6	54,8
3 CHS <i>H. calycinum</i>				98,7	82,7
4 CHS <i>H. perforatum</i>					82,7
5 ORF 1 <i>H. calycinum</i>					

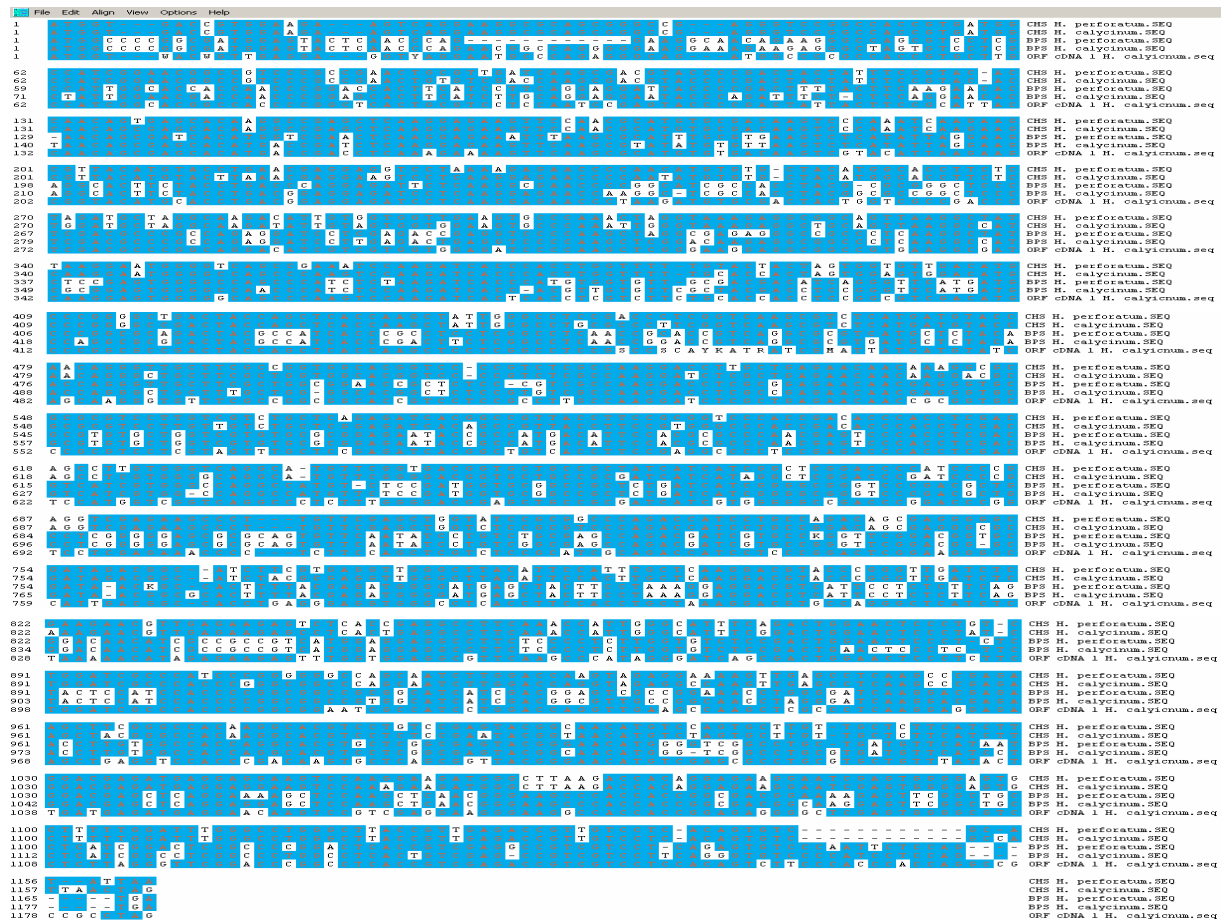


Abb. 4.30: Vergleich auf Nukleotid-Ebene von ORF 1 aus *H. calycinum* mit BPS und CHS aus *H. perforatum* und *H. calycinum*

Tab. 4.11: Nukleotid-Ebene: Prozentuale Identität von ORF 1 aus *H. calycinum* mit BPS und CHS aus *H. perforatum* und *H. calycinum*

Identität [%]	1	2	3	4	5
1 CHS <i>H. perforatum</i>		92,9	55,2	53,0	67,3
2 CHS <i>H. calycinum</i>			55,2	53,7	68,6
3 BPS <i>H. perforatum</i>				84,0	55,8
4 BPS <i>H. calycinum</i>					55,0
5 ORF 1 <i>H. calycinum</i>					

4.9 5'-RACE-PCR bei *H. perforatum* auf Basis der cDNA-Fragmente aus *H. calycinum*

Die 5'-RACE-PCR wurde mit Hilfe der genspezifischen Primer, die bisher auf *H. calycinum* angewendet wurden, auch bei *H. perforatum* durchgeführt. Diese Strategie blieb für die cDNA-Fragmente 2 und 4 ohne Erfolg. Ein Grund könnte sein, dass die Sequenz von einem oder beiden verwendeten Primern nicht exakt mit der Matrize übereinstimmt. In diesem Fall kann man versuchen, die Hybridisierungs-Temperatur etwas herabzusetzen, um den Effekt eventueller Fehlpaarungen (sogenannter Mismatches) zu minimieren. Führt dies nicht zum Erfolg, kann es nötig sein, andere Primer zu benutzen. Es ist auch möglich, dass die

nachzuweisende Sequenz nur in wenigen Kopien vorliegt. In diesem Fall kann man versuchen, durch Erhöhung der Zyklenzahl Produkte nachzuweisen. Umgekehrt sollte man bestrebt sein, unspezifische Produktbildung durch Verringerung der Zyklenzahl bzw. Erhöhung der Hybridisierungs-Temperatur zu verringern. Trotz neuer Isolierung von RNA und mehrfacher Änderung der RT-5'-RACE-PCR-Bedingungen war es nicht möglich, die cDNA-Fragmente 2 und 4 aus *H. perforatum* stromaufwärts zu isolieren. Eine Lösung dieses Problems könnte sein, zunächst die Volllänge-cDNAs zu den Fragmenten 2 und 4 aus *H. calycinum* zu isolieren. Im Anschluss könnten dann mit Hilfe der gleichen Expressions-Primer die ORFs von cDNA 2 und 4 aus *H. perforatum* vermehrt werden. Leider war dies im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Im Gegensatz zu den Klonen 2 und 4 führte die 5'-RACE-PCR bei *H. perforatum* mit den genspezifischen Primern von cDNA-Fragment 1 aus *H. calycinum* zur Amplifikation von zwei cDNA-Fragmenten, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Volllänge-cDNA 1 aus *H. calycinum* aufwiesen (Abb. 4.31, 4.32 und 4.33).

cDNA-Fragment 1-1 aus *H. perforatum*

5'-CCGAGTACCCCGACTATTACTTCCGCATTACCAACAGCGAGCACATGACCGAC
CTCAAAGAAAAGTTCAAGCGCATGTGCGACAAGTCGTACATTAAGAAGCGGTAC
ATGCACCTGACGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCATAAGATGTGCGACTACTG
GTCGCGCGACCCTCGACGCCCGGCAGGACATCGTCGTGGTGGAGATCCCCAAGCTC
GGGAAGGAGGCGGCCGTGAAGGCGATCAAGGAGTGGGGSCAGCCCAAGTCCAAG
ATCACTCACCTCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCCGGCGCCGAC-3'

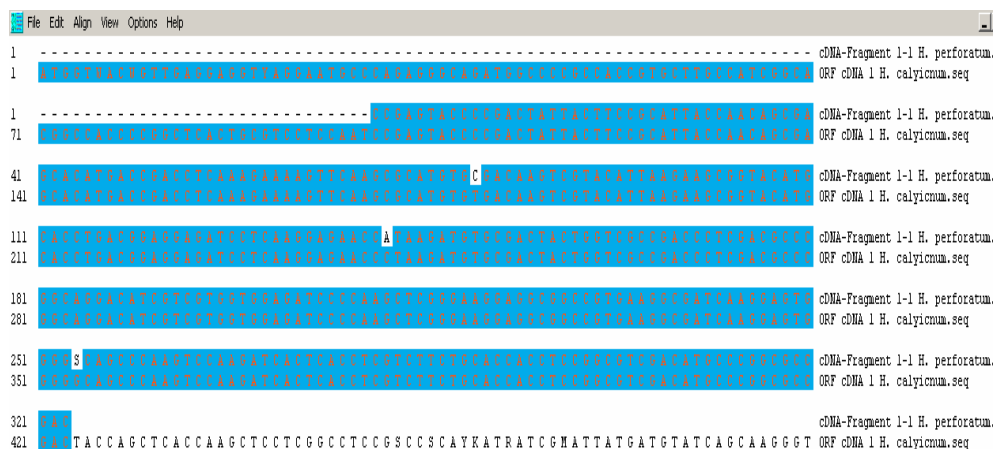


Abb. 4.31: Vergleich auf Nukleotid-Ebene von ORF 1 aus *H. calycinum* mit cDNA-Fragment 1-1 aus *H. perforatum*

Nach diesen Ergebnissen war klar, dass die cDNA 1 auch bei *H. perforatum* vorkam. Es war also möglich, die gleichen Expressions-Primer bei *H. perforatum* wie auch *H. calycinum* anzuwenden, um den cDNA 1-ORF zu isolieren.

4.10 Offener Leserahmen der Volllänge-cDNA 1 aus *H. calycinum*

In der resultierenden Volllänge-cDNA 1 aus *H. calycinum* wurde mit dem Programm Editseq der offene Leserahmen (ORF), d.h. die für das Enzym kodierende Basensequenz, lokalisiert (Abb. 4.34).

```
5'-ATGGTWACWGTTGAGGAGGTYAGGAATGCCCAGAGGGCAGATGGCCCCGCCA
CCGTGCTTGCCATCGGCACGGCCACCCCGGCTCACTGCGTCCTCCAATCCGAGTA
CCCCGACTATTACTTCCGCATTACCAACAGCGAGCACATGACCGACCTCAAAGAA
AAGTTCAAGCGCATGTGTGACAAGTCGTACATTAAGAAGCGGTACATGCACCTGA
CGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCCTAAGATGTGCGACTACTGGTCGCCGACCC
TCGACGCCCCGGCAGGACATCGTCGTGGTGGAGATCCCCAAGCTCGGGAAGGAGG
CGGCCGTGAAGGCGATCAAGGAGTGGGGGCAGCCCAAGTCCAAGATCACTCACC
TCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCGGCGCCGACTACCAGCTCAC
CAAGCTCCTCGGCCTCCGSCCSCAYKATRATCGMATTATGATGTATCAGCAAGGG
TGTTTCGCCGGCGGCACCGTCCTCCGCCTTGCCAAGGATCTCGCTGAGAACAACC
GCGGTGCCCGCGTCTCTCGTAGTTTGCTCCGAGATCACGGCTGTCACCTTCCGAGG
CCCCTCCGAGACCCACCTCGACTCCATGGTTCGGTCAGGCCCTCTTTGGGGACGGA
GCTGCCGCGATCATCGTGGGGGGCCGACCCGGACCCGGTCCTCGAGAAACCCCTCT
TCCAGCTCGTCTCCGCATCGCAGACCATCTCCCGGACTCGGAAGGGGGCCATTGA
CGGCCACCTGAGGGAGGTGGGCCTCACCTTCCACCTGCTAAAGGACGTGCCAGG
GCTCATCTCTAAAAACATAGAGAAGAGTTTGGTGGAGGCGTTCAAGCCCATAGG
GATCAGCGACTGGAACCTCCTTCTTGATCGCCACCCCGGCGGAATCGCCATC
CTGGACCAGGTTGAAGCCAAGCTCGCCCTCAAGGAGGAGAAGCTGAGGTCCACC
CGACAAGTGCTCAGCGGTTACGGGAACATGTGCGAGCGCCTGCGTGCTGTTTATAC
TTGATGAGATGAGGAACAAGTCCGTCGAGGAAGGGAAGGCCACCACCGGAGAGG
GGCTCGAGTGGGGCGTCTCTTAGGGTTCGGACCCGGCCTCACCGTCGAGACCGT
CGTCTCCACAGTCTTCCCACCCACCAGGCCCGCCGCTAG-3'
```

Abb. 4.34: ORF 1 aus *H. calycinum*

4.10.1 Aminosäuren-Sequenz des cDNA 1-ORF aus *H. calycinum*

Mit Hilfe des Programms Editseq wurde die Basensequenz in die Aminosäuresequenz umgeschrieben (Abb. 4.35) und die Molekülmasse des resultierenden Polypeptids errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-12 zusammengefasst.

MVTVEEV RNAQRADGPATVLAIGTATPAHCVLQSEYPDYYFRITNSEHMTDLKEKFK
 RMC DKSYIKKRYMHLTEEILKENPKMCDYWSPTLDARQDIVVVEIPKLGKEAAVKAI
 KEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPHXXRIMMYQQGCFAGGTV
 LRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSMVGQALFGDGA AAIIVGAD
 PDPVLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKNIEKSLVEAF
 KPIGISDWNLSLFWIAHPGGIAILDQVEAKLALKEEKL RSTRQVL SGYGNMSSACVLFIL
 DEMRNKSVEEGKATTGEGLEWGVLLGFGPGLTVETVVLHSLPTHQAAA

Abb. 4.35: Aminosäuren-Sequenz des ORF 1 aus *H. calycinum*

Tab. 4.12: Eigenschaften des ORF 1

	Basen	Aminosäuren	M (Da)	Isoel. Punkt
ORF 1 <i>H. calycinum</i>	1185	394	43227,98	6,279

4.10.2 Expressionsprimer-Design für ORF 1

Um das durch die Volllänge-cDNA 1 kodierte Protein heterolog zu exprimieren, musste zunächst der ORF fehlerfrei aus einem cDNA-Pool amplifiziert werden. Dazu wurden die Expressionsprimer 5 F1 orf, 5 32 F1 orf, 5 33 F1 orf, 3 F1 orf und 3 F1 orf kurz (Tab. 4.13) synthetisiert und in einer PCR mit der korrekturlesenden *Pfu*-Polymerase eingesetzt (3.9). Die Expressionsprimer wurden so konstruiert, dass sie jeweils eine Restriktionsschnittstelle (Tab. 4.14) enthielten, um den ORF in den Expressionsvektor in sense-Richtung ligieren zu können.

Tab. 4.13: Expressions-Primer für die Amplifikation des cDNA 1-ORF

sense-Expressions-Primer 1 (<i>NheI</i>)	reverse-Expressions-Primer 2 (<i>KpnI</i>)
5 F1 orf	3 F1 orf
5 32 F1 orf	3 F1 orf kurz
5 33 F1 orf	

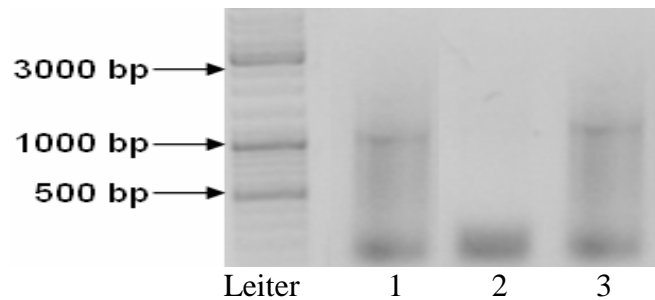
Tab. 4.14: Restriktionsschnittstellen der Expressionsprimer

5 F1 orf	5'-gca tgc tag cat ggt (at)ac (at)gt tga gga ggt (ct)ag-3'
5 32 F1 orf	5'-gca tgc tag cat ggt aac tgt tga gga ggt cag-3'
5 33 F1 orf	5'-gca tgc tag cat ggt tac agt tga gga ggt tag-3'
3 F1 orf	5'-gta cgg tac cct agg cgg cgg cct gg-3'
3 F1 orf kurz	5'-gta cgg tac cct agg cgg cgg c-3'

4.10.3 ORF 1-Amplifikation aus *H. perforatum* und *H. calycinum* mit *Pfu*-Polymerase

Der cDNA 1-ORF aus den beiden *Hypericum*-Spezies wurde reamplifiziert. Als Matrice wurde eine poly(A⁺)-RNA mit dem 5'CDS-Primer in cDNA umgeschrieben. Da bei der herkömmlichen PCR mit *Taq*-Polymerase eine Fehlerrate von $8,0 \times 10^{-6}$ auftritt, wurde die

korrekturlesende *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt (3.9). Diese Polymerase besitzt eine ausgeprägte 3'→5' Exonuclease-Aktivität und die Fehlerrate liegt bei $1,3 \times 10^{-6}$ (Cline et al., 1996). Im Gegensatz zu der *Taq*-Polymerase fügt die *Pfu*-Polymerase an die amplifizierte Sequenz keinen Adenin-Rest an, so dass das Produkt glatte Enden (blunt ends) aufweist. Die Expressions-Primer waren 5 F1 orf und 3 F1 orf. Da nach einmaliger PCR mit 30 Zyklen keine Amplifikate auf dem Agarosegel zu erkennen waren, wurden vom ersten PCR-Ansatz 0,5 µl für eine zweite Amplifikation unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Dieser Schritt führte zur Generierung einer PCR-Bande sowohl aus *H. calycinum* als auch *H. perforatum* (Abb. 4.35). Die Größe der Banden lag allerdings nicht bei den erwarteten 1185 bp, sondern nur bei ~ 1000 bp.



- 1: *H. calycinum* ORF 1 (~ 1000 bp)
- 2: Negative Kontrolle
- 3: *H. perforatum* ORF 1 (~ 1000 bp)

Abb. 4.36: Agarose-Gelelektrophorese der mit *Pfu*-Polymerase reamplifizierten ORFs 1 aus *H. perforatum* und *H. calycinum*

4.10.4 Restriktions-Verdau der ORFs 1 und pRSET B

Die erhaltenen ORFs 1 wurden mit den Endonukleasen *Nhe*I und *Kpn*I verdaut (3.13). Die ORFs selbst wiesen diese Schnittstellen nicht auf. Durch die Verwendung von Schnittstellen in den Expressionsprimern konnten klebrige Enden an den jeweiligen Flanken der ORFs geschaffen werden. Der Expressionsvektor pRSET B (Abb. 4.37) wies in der MCS die gleichen Schnittstellen auf, so dass eine gerichtete Ligation in den Vektor vorgenommen werden konnte.

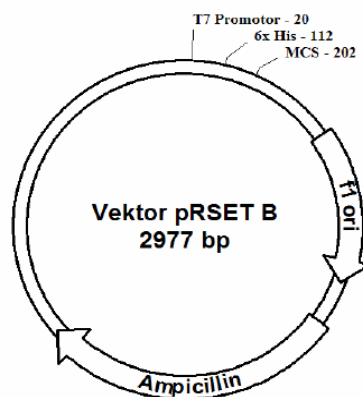


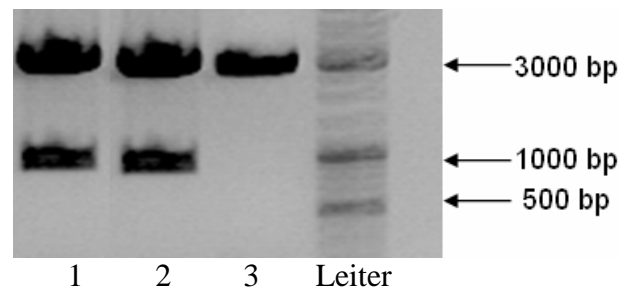
Abb. 4.37: Expressionsvektor pRSET B

4.10.5 Ligation

Nach dem Restriktions-Verdau von ORFs und Expressionsvektor wurden die Komponenten durch die T4-DNA-Ligase verbunden (3.14).

4.10.6 Transformation von DH5 α und BL21

Diese Konstrukte wurden zunächst in *E. coli* DH5 α transferiert und vermehrt. Dann folgten Plasmidisolierung und Kontrollsequenzierung. Die Insert-Größen lagen für die ORFs aus beiden *Hypericum*-Spezies wieder nur bei ~ 1000 bp (Abb. 4.38).



- 1: pRSET B-Vektor und *H. calycinum* ORF 1 (~ 1000 bp)
- 2: pRSET B-Vektor und *H. perforatum* ORF 1 (~ 1000 bp)
- 3: pRSET B-Vektor ohne Insert-cDNA (Negative Kontrolle)

Abb. 4.38: Agarose-Gelelektrophorese des mit *Nhe*I und *Kpn*I verdauten pRSET B-Vektors, der die ORFs 1 aus *H. perforatum* bzw. *H. calycinum* enthielt

4.10.7 ORF 1-Amplifikation aus *H. perforatum* und *H. calycinum* mit *Pfx*-Polymerase

Da die Reamplifikation des ORFs 1 aus den beiden *Hypericum*-Spezies mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase (Abb. 4.36) lediglich Amplifikate mit einer Größe von ~1000 bp ergab, wurde eine erneute Reamplifikation durchgeführt, aber diesmal mit der *Pfx*-Polymerase (Tab. 4.15 und 4.16).

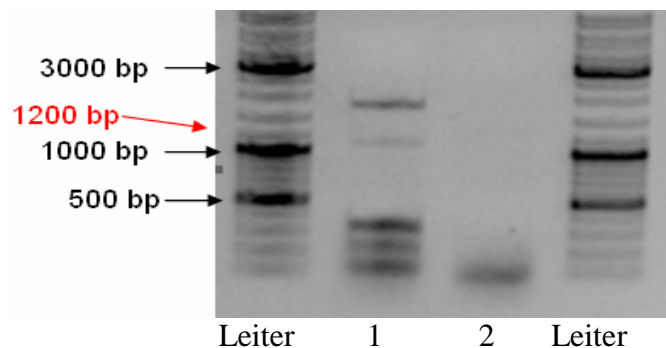
Tab. 4.15: *Pfx*-PCR-Reaktion

Master Mix	Volumen
H ₂ O	38 μ l
Buffer	5 μ l
MgSO ₄	1 μ l
dNTP mix	1,5 μ l
Primer 1	1 μ l
Primer 2	1 μ l
cDNA	2 μ l
<i>Pfx</i> -Polymerase	0,5 μ l

Tab. 4.16: *Pfx*-PCR-Programm

Schritt-Nr.	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus
1	Start-Denaturierung	94	120	1x
2	Pause	70	0	
3	Denaturierung	94	15	25x
4	Annealing	55	30	
5	Elongation	68	240	
6	Finale Elongation	68	1200	1x
7	Pause	12	0	

Sowohl für *H. calycinum* als auch für *H. perforatum* wurde neben unspezifischen Banden die gewünschte Bande der korrekten Größe von ~1200 bp erhalten (Abb. 4.39).



- 1: *H. calycinum* ORF 1 (~1200 bp)
 2: Negative Kontrolle

Abb. 4.39: Agarose-Gelelektrophorese des mit *Pfx*-Polymerase reamplifizierten ORF 1 aus *H. calycinum*

Dieses positive Ergebnis ist wahrscheinlich auf die veränderten Pufferbedingungen beim Einsatz der *Pfx*-Polymerase zurückzuführen. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, die *Pfx*-Reamplifikate zu klonieren und die kodierten Proteine heterolog in *E. coli* zu exprimieren.

5. Diskussion

5.1 Johanniskraut (*Hypericum perforatum*)

Seit über 2000 Jahren wird Johanniskraut als Heilpflanze verwendet, z.B. für die Behandlung von Wunden, leichten Verbrennungen, Hautentzündungen u.a. Heutzutage werden neben den synthetischen Antidepressiva Zubereitungen aus dem Johanniskraut zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen eingesetzt.

Johanniskraut-Extrakte enthalten eine Vielzahl von Stoffen wie z.B. Flavonoide (Quercetin, Amentoflavon), Naphthodianthrone (Hypericin, Pseudohypericin), Xanthone (1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon, Kielcorin), ätherisches Öl (Monoterpene, 2-Methyl-3-buten-2-ol) und Acylphloroglucin-Derivate (Hyperforin, Adhyperforin).

An der antidepressiven Wirkung von *Hypericum*-Präparaten sind vor allem die Hyperforine beteiligt, eventuell auch noch Hypericine und Flavonoide (Müller, 2003; Butterweck, 2003). Der am besten untersuchte Inhaltsstoff ist das Hyperforin, das ein strukturell wie funktionell neuartiges Antidepressivum darstellt (Müller, 2003).

5.2 Hyperforin

5.2.1 Hyperforin-Gehalt

5.2.1.1 Intakte *H. perforatum*-Pflanzen

Nach den Untersuchungen von Tekelova et al. (2000) liegen in intakten *H. perforatum*-Pflanzen hohe Hyperforin-Konzentrationen in den Knospen, Blüten und Früchten vor.

Der Hyperforin-Gehalt macht in 3 mm großen Knospen 2,5 % des Trockengewichts aus und steigt bis zu 7 % in den 9 - 13 mm großen Knospen an (Abb. 5.1)

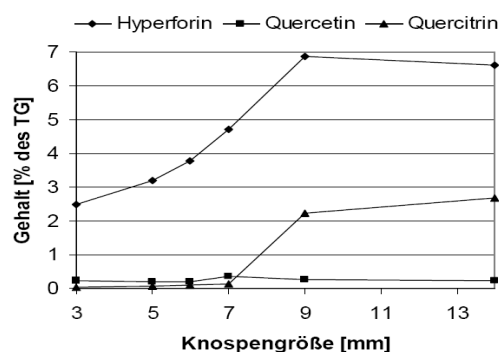


Abb. 5.1: Gehalt an Hyperforinen und Flavonoiden in sich entwickelnden Knospen von *H. perforatum* (Tekelova et al., 2000)

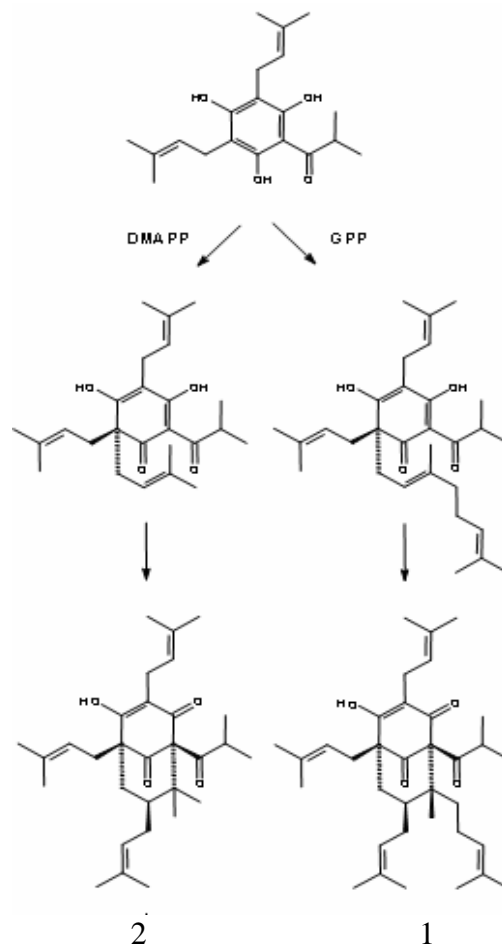
Früchte enthalten zudem 2 % Adhyperforin, dessen Gehalt in Blüten mit 0,2% noch relativ gering ist (Maisenbacher und Kovar, 1992).

Auf der Gewebe-Ebene wurde Hyperforin in den durchscheinenden Drüsen lokalisiert, wo es zusammen mit ätherischem Öl abgelagert wird. Flavonoide akkumulieren hauptsächlich in älteren Knospen und Blüten. Mit dem Abfall der Kronblätter geht ihr Gehalt dramatisch zurück.

Nach den Angaben von Tekelova et al. (2000) wurden in der vorliegenden Arbeit etwa 5 mm große Knospen als mRNA-Quelle geerntet.

5.2.1.2 Zell- und Kalluskulturen von *H. perforatum*

In Zell- und Kalluskulturen von *H. perforatum* wurden keine Hyperforine oder nur Spuren beobachtet. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass in Sprosskulturen von *H. perforatum* die Akkumulation von Secohyperforin durch Jasmonate zweifach und Mannan vierfach erhöht werden kann (Charchoglyan et al., 2007). Interessanterweise wurde durch Phytohormone eine differenzielle Akkumulation von Hyperforinen induziert. Während ansteigende Konzentrationen von Benzylaminopurin die Bildung von Hyperforin stimulierten, führten zunehmende Konzentrationen von Naphthylelessigsäure zu erhöhten Gehalten von Secohyperforin. Hyperforin und Secohyperforin leiten sich wahrscheinlich von einem Verzweigungspunkt im Biosyntheseweg ab (Abb. 5.2). Das diprenylierte Acylphloroglucinol-Intermediat wird entweder mit einem Dimethylallyl (DMAPP)-Rest oder einem Geranyl (GPP)-Rest verknüpft. Ob der metabolische Verzweigungspunkt auf differenziell regulierte aromatische Prenyltransferasen mit Prenyldonor-Präferenz entweder für DMAPP oder GPP zurückgeht, bleibt zu prüfen.



1: Hyperforin, 2: Secohyperforin

Abb. 5.2: Vorgeschlagener Verzweigungspunkt in der Biosynthese der Hyperforine, der zur Bildung von Hyperforin und Secohyperforin führt (Charchoglyan et al., 2007)

5.2.1.3 Intakte *H. calycinum* -Pflanzen

Während die oberirdischen Teile von *H. perforatum* 2 – 4 % Hyperforine enthalten, wurden in einigen anderen *Hypericum*-Spezies Spuren von Hyperforin detektiert (*H. barbatum*, *H. richeri*, *H. rumeliacum*, *H. maculatum*, *H. tetrapterum*, *H. hirsutum*, *H. linarioides*, *H. olympicum*; Smelcerovic and Spiteller, 2006).

Im Großblütigen Johanniskraut (*H. calycinum*) wurden noch keine Hyperforine gefunden. Allerdings enthält diese Spezies eine Anzahl von verwandten prenylierten Phloroglucinol-Derivaten (Abb. 5.3; Decosterd et al., 1991; Gronquist et al., 2001). In den Kronblättern von *H. calycinum* sind sie zusammen mit Flavonoiden an der Ausbildung von UV-reflektierenden und UV-absorbierenden Zonen beteiligt (Gronquist et al., 2001). Darüber hinaus kommen sie in hoher Konzentration in der Wand des Fruchtknotens vor. Der Fruchtknoten-Inhalt ist dagegen nahezu frei von den Verbindungen. Dies weist darauf hin, dass die Phloroglucinol-Derivate sowohl Aufgaben der Anlockung als auch der Abwehr wahrnehmen.

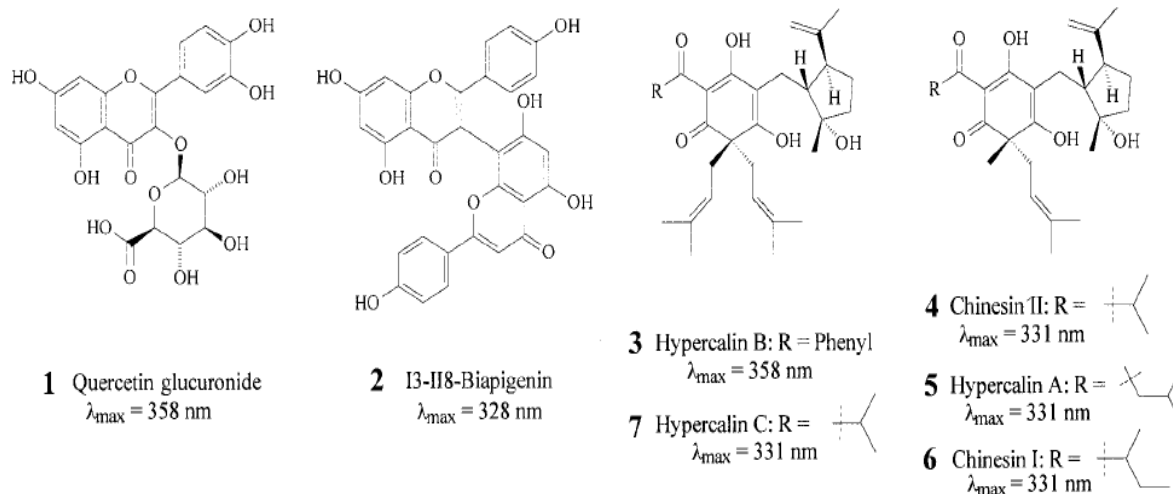


Abb. 5.3: Flavonoide (1,2) und dearomatisierte isoprenylierte Phloroglucinole (3,4,5,6,7) aus *H. calycinum* (Gronquist et al., 2001)

Die Biosynthese der dearomatisierten isoprenylierten Phloroglucinol-Derivate und der Hyperforine scheint ähnlich zu sein. Das Grundgerüst, Isobutyrophenon oder Isovalerophenon, wird von einer Polyketid-Synthase Typ III gebildet. Dann werden die Grundgerüste von Prenyltransferasen alkyliert und diese Reste anschließend zyklisiert.

Den Angaben von Gronquist et al. (2001) folgend wurden in der vorliegenden Arbeit Fruchtknoten aus Knospen und Blüten sowie Früchte von *H. calycinum* als mRNA-Quelle verwendet.

5.2.1.4 Zellkulturen von *H. calycinum*

Während in Zellkulturen von *H. perforatum* bisher keine Hyperforine detektiert wurden, kommen in Zellkulturen von *H. calycinum* diese Verbindungen in geringer Menge vor (Klingauf, 2005). Interessanterweise war die Hauptkomponente das Adhyperforin, während die Konzentration des Hyperforins etwa zehnmal geringer war. Verglichen mit den Konzentrationen in intakten Pflanzen war der Adhyperforin-Gehalt in *H. calycinum*-Zellkulturen mit 0,03 % des Trockengewichts allerdings relativ gering (Zapletalová, 1999). Die Konzentration der Hyperforine konnte nicht durch Elicitierung gesteigert werden. Elicitoren sind z.B. Zellwandbestandteile von pathogenen Organismen, die die Bildung von Phytoalexinen stimulieren (Schröder, 1998). In vielen Zellkulturen konnte die Produktion von Sekundärmetaboliten durch Zugabe von Jasmonaten, die als pflanzliche Stresshormone verschiedene Abwehrreaktionen induzieren, gesteigert werden (Charchoglyan et al., 2007). In *H. calycinum*-Zellkulturen konnte aber durch Zugabe von Methyljasmonat und Isoleucyl-Jasmonat zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums keine signifikante Steigerung der Hyperforin- oder Adhyperforin-Produktion erzielt werden (Zapletalová, 1999).

Für die Zellkulturen von *H. calycinum* wurde ein typischer Wachstumsverlauf beobachtet (Klingauf, 2005). Nach einer Verzögerungsphase von zwei Tagen vermehrten sich die Zellkulturen linear zwischen Tag 2 und 4 und traten dann in die Abknick- und Stationärphasen ein, wobei sich die Zellausgangsmasse verdreifachte (Abb. 5.4). Parallel zum

Zellwachstum wurde der Adhyperforin-Gehalt der Suspensionskulturen mittels HPLC gemessen. Er stieg von Tag 2 bis 6 linear an und erreichte das Maximum an Tag 8.

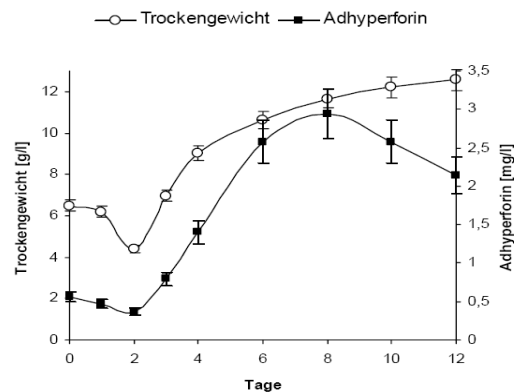


Abb. 5.4: Wachstum und Adhyperforin-Bildung von *H. calycinum*-Zellkulturen (Zapletalová, 1999; Klingauf, 2005)

Die Veränderung der spezifischen Aktivitäten von drei Polyketid-Synthasen Typ III wurde während des Zellkulturwachstums untersucht (Abb. 5.5; Klingauf et al., 2005). Die Isobutyrophenon-Synthase-Aktivität stieg nach der Überimpfung der Zellen schnell an und erreichte ihr Maximum bereits am 2. Tag. Es folgte ein Plateau bis zum 4. Tag, wonach die Aktivität wieder abnahm. Die Benzophenon-Synthase- und Chalkon-Synthase-Aktivitäten stiegen langsamer an und erreichten ihre Maxima am 3. bzw. 4.-5. Tag.

Folglich wurden für die Klonierung der Isobutyrophenon-Synthase-cDNA in dieser Arbeit die Zellkulturen am 1. bis 3. Tag nach Überimpfung in frisches BDS Medium abgeerntet und als mRNA-Quelle genutzt.

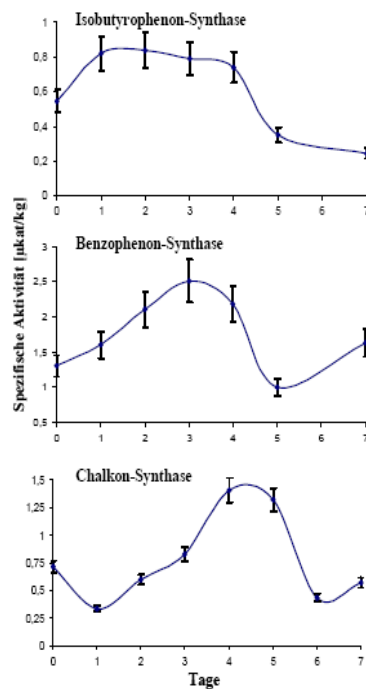


Abb. 5.5: Veränderung der spezifischen Aktivitäten der Isobutyrophenon-Synthase, Benzophenon-Synthase und Chalkon-Synthase während des Wachstums von *H. calycinum*-Zellkulturen (Klingauf et al., 2005)

Die erste Prenylierungsreaktion (Abb. 5.6) wurde ebenfalls in *H. calycinum*-Zellkulturen nachgewiesen (Boubakir et al., 2005). Das Enzym ist im Gegensatz zu den bekannten Prenyltransferasen löslich und seine Aktivität ist Fe^{2+} -abhängig. Nach der Zugabe von Phlorisobutyrophenon und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) zu zellfreien Extrakten aus drei Tage alten *H. calycinum*-Zellkulturen konnte ein enzymatisches Produkt mittels HLPC und GC-MS-Analyse detektiert und als Dimethylallylphlorisobutyrophenon identifiziert werden (Boubakir et al., 2005). Die beteiligte Prenyltransferase akzeptiert nur DMAPP als Prenyldonor und zeigt keine Aktivität mit GPP und Farnesylpyrophosphat (FPP). Als Prenylakzeptor wird Phlorisobutyrophenon bevorzugt, aber auch Phloracetophenon kann prenyliert werden.

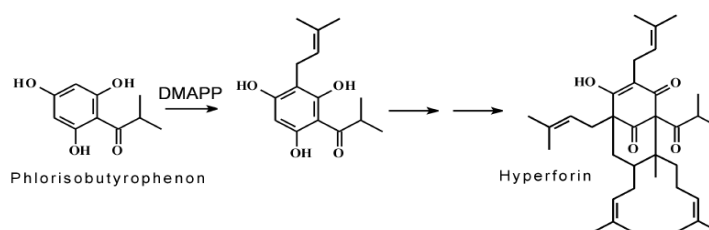


Abb. 5.6: Der erste Prenylierungsschritt in der Hyperforin-Biosynthese mit DMAPP als Prenyldonor (Boubakir et al., 2005)

Die Veränderung der spezifischen Enzymaktivität der ersten Prenyltransferase während des Zellkulturwachstums wurde untersucht (Abb. 5.7; Boubakir et al., 2005). Die Prenyltransferase-Aktivität stieg nach dem Transfer der Zellen in frisches Medium schnell an und erreichte ihr Maximum am 3. Tag. Danach erst erfolgte die Zunahme des Adhyperforin-Gehalts, bis das Maximum am 6. Tag erreicht war.

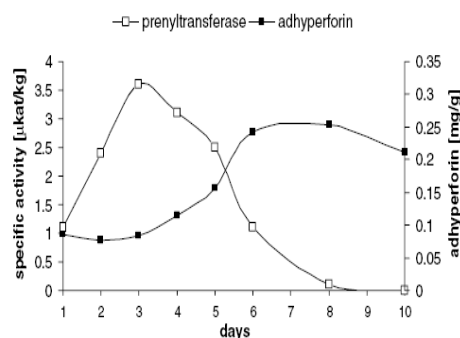


Abb. 5.7: Adhyperforin-Bildung und Veränderung der spezifischen Prenyltransferase-Aktivität während des Zellkulturwachstums von *H. calycinum* (Boubakir et al., 2005)

5.2.2 Hyperforin-Biosynthese in *Hypericum*

Eine chemische Totalsynthese des Hyperforins ist trotz großer Anstrengungen bisher fehlgeschlagen (Nicolaou et al., 2005). Auch die Biosynthese ist bisher wenig verstanden. Sie kann in zwei Abschnitte gegliedert werden: erstens die Bildung des Grundgerüsts und nachfolgend die Prenylierungsreaktionen. Der vorgeschlagene Biosyntheseweg ist in Abb. 5.8 nochmals gezeigt.

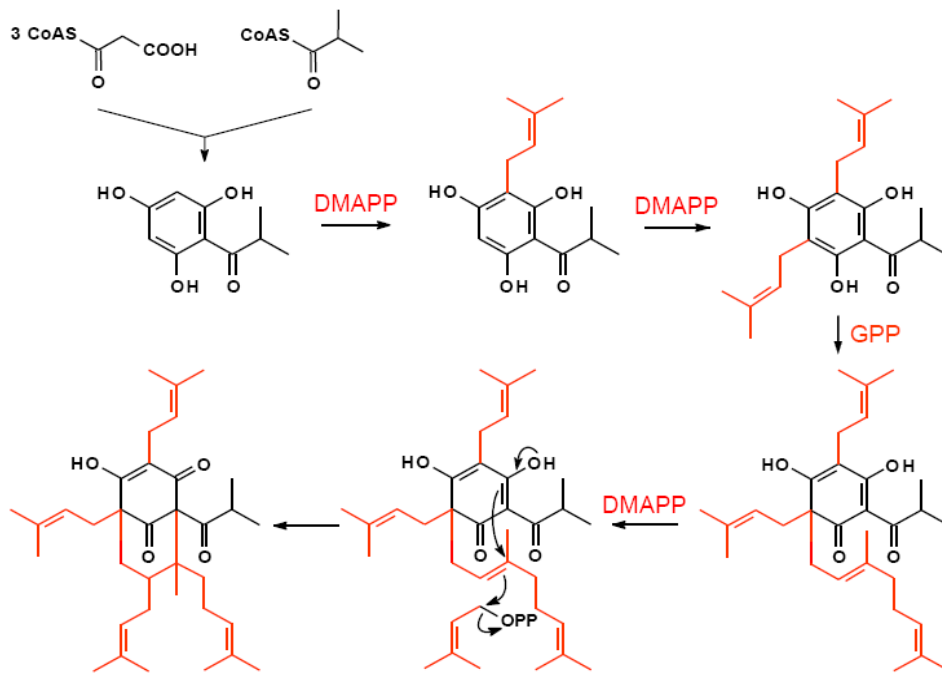


Abb. 5.8: Vorgeschlagener Hyperforin-Biosyntheseweg (Beerhues, 2006)

Die Bildung des Grundgerüsts wurde in den Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen (Abb. 5.9; Klingauf et al., 2005). Sie wird von einer Typ III-PKS, der Isobutyrophenon-Synthase (BUS), katalysiert. Dieses Enzym kondensiert das aliphatische Startermolekül Isobutyryl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem intermediären Tetraketid, das im selben aktiven Zentrum zum Phlorisobutyrophenon zyklisiert wird. Der Anstieg der BUS-Aktivität ging wie der Anstieg der Prenyltransferase-Aktivität der Adhyperforin-Akkumulation voraus (Abb. 5.5 und 5.7). Allerdings blieb die spezifische Aktivität über mehrere Tage relativ hoch.

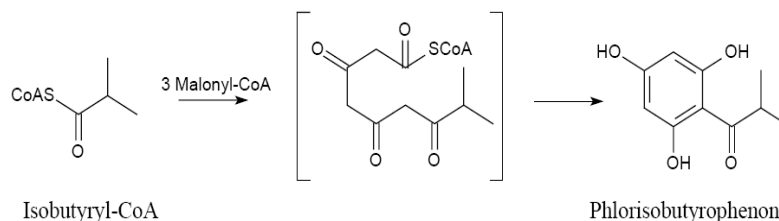


Abb. 5.9: Reaktion der Isobutyrophenon-Synthase (BUS; Klingauf et al., 2005).

5.3 Polyketid-Synthasen Typ III aus *Hypericum*

Die Isobutyrophenon-Synthase ist ein Mitglied der Typ III-PKS-Superfamilie. Diese Enzyme treten in Pflanzen und Bakterien auf und katalysieren die Bildung einer ganzen Reihe von Naturstoffen durch Verknüpfung von Thioester-gebundenen Startermolekülen mit mehreren aus Malonyl-CoA stammenden Acetyl-Einheiten zu linearen Polyketiden, die dann zyklisiert werden (Schröder, 1997). Dieser Reaktionstyp wurde erstmals von Birch und Donovan (1953) beschrieben.

Der erste funktionell wie strukturell beschriebene und damit bekannteste Vertreter dieser Enzymfamilie ist die Chalkon-Synthase, deren Reaktion in Abb. 5.10 gezeigt ist.

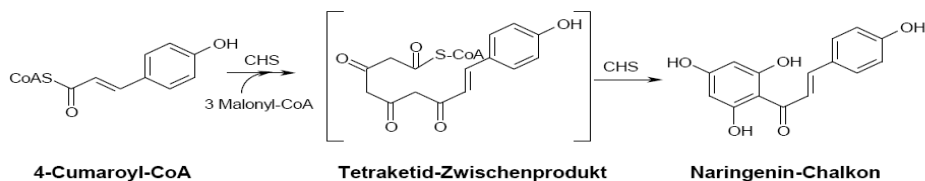


Abb. 5.10: Reaktion der Chalkon-Synthese

Die CHS wurde kristallisiert und in ihrer Raumstruktur aufgeklärt (Ferrer et al., 1999). In jeder Untereinheit des Homodimers (ca. 84 kDa) befindet sich ein unabhängiges aktives Zentrum, das aus einem langen CoA-Bindetunnel, einer Substratbindetasche und einer Zyklisierungstasche besteht. Hier werden alle Schritte der Biosynthese katalysiert: Decarboxylierung, sequentielle Kondensation (Starter-CoA Ester und 3 Malonyl-CoA) und intramolekulare Zyklisierung des linearen Intermediats. Inzwischen wurden weitere Raumstrukturen von verwandten Typ III PKS wie z.B. Stilben-Synthase aufgeklärt (Austin et al., 2004). Damit eröffnet sich neben dem Verständnis des Reaktionsmechanismus die Chance, durch ortsgerichtete Mutagenie die Vielfalt an Typ III PKS-Funktionen weiter zu diversifizieren. Kürzlich konnte die Benzophenon-Synthase aus *H. androsaemum* durch eine Einzelmutation in eine Phenylpyron-Synthase überführt werden (Klunt et al., 2009). Phenylpyron-Synthase wurde bisher nicht als natürlich vorkommende Typ III PKS-Variante detektiert. Allgemein unterscheiden sich PKS III in der Präferenz für das Startermolekül, der Zahl der Additionen von C₂-Einheiten und dem Mechanismus der intramolekularen Zyklisierung.

In *Hypericum*-Arten wurden bislang drei Typ III Polyketid-Synthasen nachgewiesen (Abb. 5.11; Klingauf et al., 2005). Neben der Chalkon-Synthase (CHS) und Isobutyrophenon-Synthase (BUS) kommt noch die Benzophenon-Synthase (BPS) vor, die die sequentielle Kondensation von Benzoyl-CoA mit 3 Molekülen Malonyl-CoA katalysiert. Das lineare intermediäre Tetraketid wird dann im selben aktiven Zentrum zum Phlorbenzophenon zyklisiert.

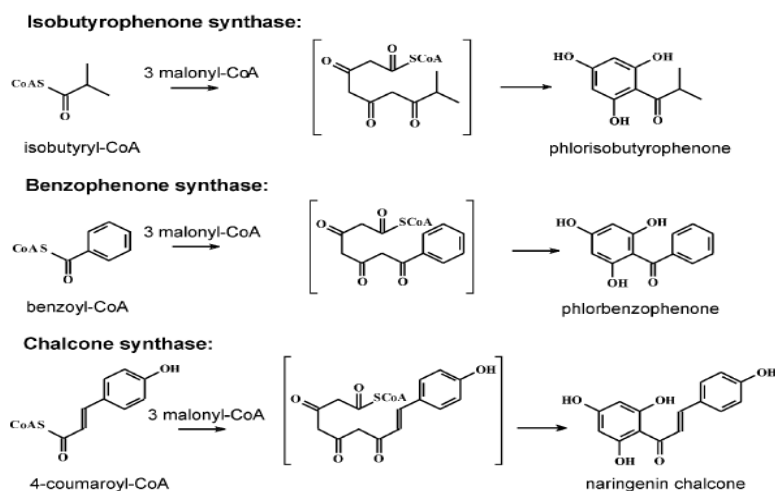


Abb. 5.11: Reaktionen von drei Typ III Polyketid-Synthasen aus *Hypericum*-Arten (Klingauf et al., 2005)

Die Benzophenon-Synthase ist das Schlüsselenzym des Benzophenon- und Xanthon-Stoffwechsels (Beerhues and Liu, 2009). Einfache Benzophenone wie das Phlorbenzophenon können multiple Prenylierungen durchlaufen (Abb. 5.12). Durch intramolekulare Zyklisierung der angefügten Prenylreste kommt es zur Bildung von komplexen polyzyklischen Verbindungen mit käfigartigen Gerüsten. Darunter befinden sich viele Moleküle mit interessanten pharmakologischen Eigenschaften. Alternativ wird das 2,3,4,6-Tetrahydroxybenzophenon regioselektiv zum 1,3,5- bzw. 1,3,7-Trihydroxyxanthon zyklisiert. Von diesen Isomeren leiten sich alle natürlichen Xanthone ab.

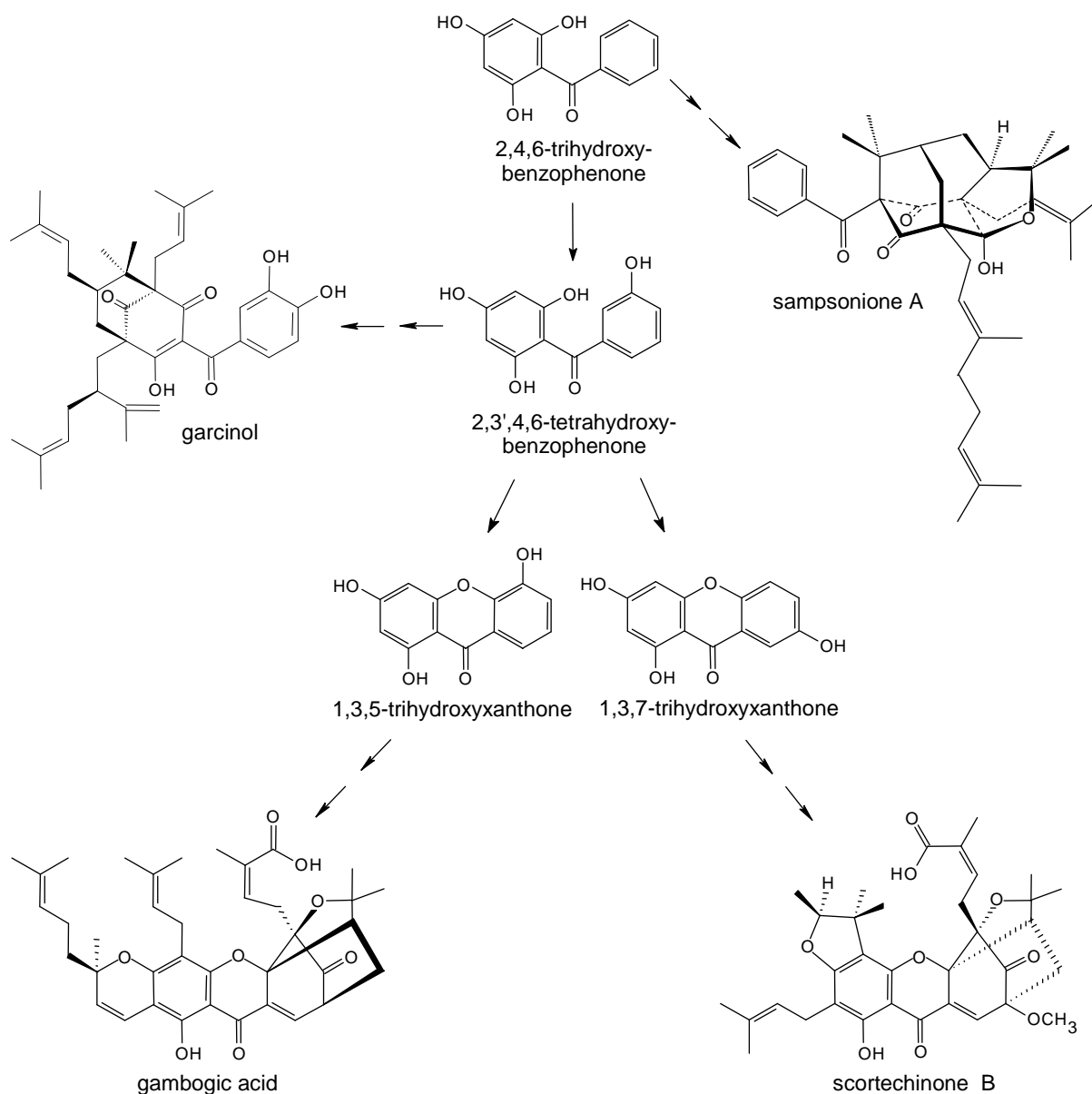


Abb. 5.12 Biosynthese von Benzophenonen und Xanthonen mit Beispielen aktiver Verbindungen (Beerhues and Liu, 2009)

Tab. 5.1: Prozentuale Identität von ausgewählten PKS auf Aminosäure-Ebene

Identität [%]	1	2	3	4	5
1 BPS <i>H. androsaemum</i>		57,7	57,8	53,3	47,6
2 CHS <i>H. androsaemum</i>			98,5	72,6	58,5
3 CHS <i>H. perforatum</i>				72,2	59,1
4 VPS <i>Humulus lupulus</i>					55,6
5 VPS <i>Psilotum nudum</i>					

Im Abgleich der selben fünf PKS (Abb. 5.14) konnten die drei katalytisch wichtigen und hoch konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums (Cys 164, His 303, Asn 336) detektiert werden. Darüber hinaus gab es mehrere Bereiche mit hochkonservierten Aminosäuren-Abfolgen. Da die Übereinstimmung der VPS aus Hopfen mit anderen CHS-verwandten Enzymen bei 73 % lag und die Identität der BPS aus *H. androsaemum* mit der CHS aus der selben Spezies 60 % ausmachte, wurde davon ausgegangen, dass auch die gesuchte BUS mit anderen Typ III PKS eine Homologie von nur 60 bis 80 % zeigen sollte.

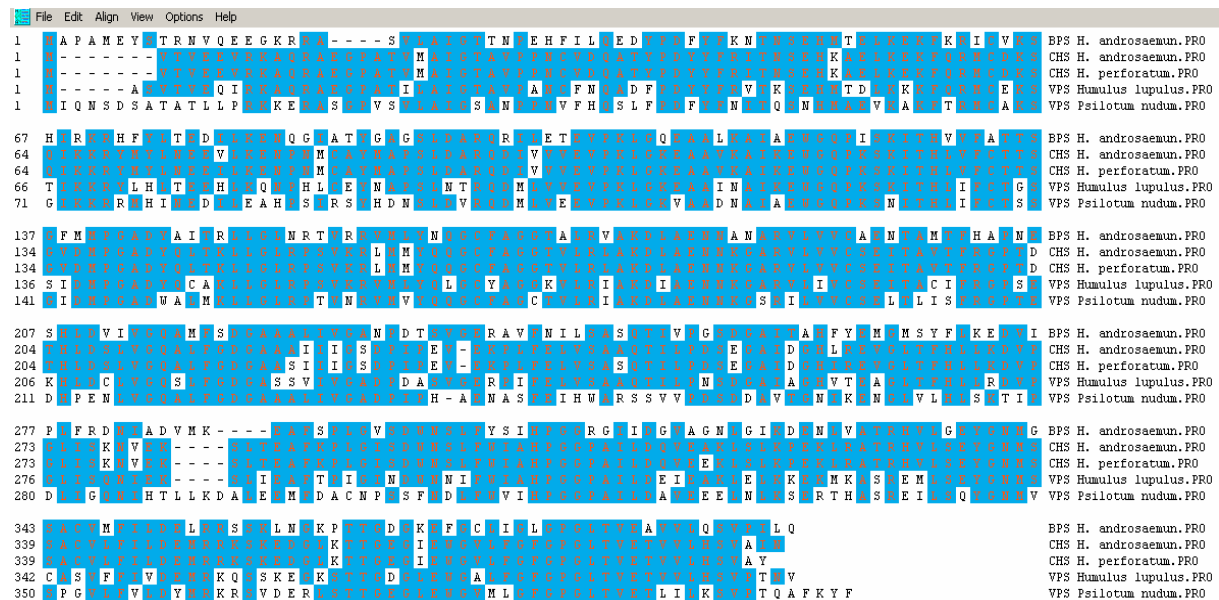


Abb. 5.14: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von fünf ausgewählten PKS (BPS und CHS aus *H. androsaemum*, CHS aus *H. perforatum*, VPS aus *Humulus lupulus* und *Psilotum nudum*)

5.5 cDNA Klonierung der Isobutyrophenon-Synthase

Die cDNA-Klonierung der BUS erwies sich als wesentlich schwieriger als ursprünglich angenommen, was natürlich auch damit zusammenhing, dass bereits cDNAs für zwei PKS-Funktionen aus den *Hypericum*-Spezies kloniert worden waren (CHS und BPS) und es jetzt die dritte zu isolieren galt. Für die Amplifikation von PKS III-Fragmenten wurden 4 degenerierte forward- und 3 degenerierte reverse-Primer entworfen, die sich von konservierten Regionen bekannter PKS III-Sequenzen ableiteten. Theoretisch sollten durch Verwendung dieser Primer in der PCR unterschiedliche PKS-Fragmente mit höheren oder niedrigeren Identitäten zu bekannten PKS amplifiziert werden. Viele der erhaltenen

Amplifikate wurden nach der Sequenzierung und dem Vergleich mit der Datenbank als Fragmente der CHS und BPS identifiziert. Viele Pflanzen besitzen mehrere Kopien von CHS-Genen, die in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien exprimiert werden (Austin und Noel, 2003). Manche der Isoenzyme werden konstitutiv exprimiert, bei anderen wird die Transkription durch UV-Strahlung, Verletzung oder Pathogene induziert. Auch die BPS in *H. androsaemum* ist von einer Genfamilie aus 5 - 6 Mitgliedern kodiert (B. Liu, persönliche Mitteilung).

Trotz dieser schwierigen Ausgangsbedingungen wurden drei cDNA-Fragmente aus *H. calycinum* gewonnen, die nur 77 - 89 % Identität mit CHS und 47 - 59 % Identität mit BPS aufwiesen (Abb. 4.13 und Tab. 4.6). Mittels 3'-RACE-PCR wurden die Klone stromabwärts vervollständigt. Die anschließende 5'-RACE- und 5'-TAIL-PCR konnten bislang eines der cDNA-Fragmente aus *H. calycinum* in einen Volllänge-Klon überführen. Dessen Identität mit CHS und BPS beträgt 83 bzw. 56% auf Aminosäure-Ebene und 69 bzw. 56 % auf Nukleotid-Ebene. Der entsprechende ORF wurde auch aus *H. perforatum* isoliert. Die kodierten Proteine müssen jetzt durch heterologe Expression in *E. coli* der funktionellen Analyse zugeführt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Dabei gilt zu prüfen, ob der ORF für Isobutyrophenon-Synthase oder 2-Methylbutyrophenon-Synthase (2-MBS) kodiert, da in Pflanzen von *H. perforatum* Hyperforin, in Zellkulturen von *H. calycinum* aber Adhyperforin vorherrscht.

Sollte der ORF für BUS oder 2-MBS kodieren, stünde erstmals eine molekulare Sonde für die Untersuchung der Hyperforin-Biosynthese zur Verfügung, da bislang auch die Klonierung einer Prenyltransferase-cDNA nicht erfolgreich war. Mit Hilfe dieser Sonde oder genspezifischer Primer könnte die differenzielle Expression von CHS, BPS und BUS/2-MBS in *Hypericum*-Arten untersucht werden. Ferner könnten spezifische Antikörper gegen BUS/2-MBS, BPS bzw. CHS verwendet werden, um die Lokalisation der drei Typ III PKS im Johanniskraut auf Gewebe- und Zellebene aufzuklären. Erste Erkenntnisse zur immunchemischen Lokalisation von CHS und BPS wurden kürzlich gewonnen (Belkheir, 2009). Langfristig könnte es möglich sein, den Sekundärstoffwechsel der Arzneipflanze *H. perforatum* gezielt zu beeinflussen, um in transgenen Pflanzen ein verändertes Spektrum an Hyperforinen zu erzeugen.

6. Zusammenfassung

- Zubereitungen aus dem Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) werden zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen eingesetzt. Ihre Wirksamkeit und gute Verträglichkeit wurden in zahlreichen klinischen Studien belegt. Die Wirkung beruht wahrscheinlich auf dem Zusammenspiel mehrerer Inhaltsstoffe. Maßgeblich beteiligt ist ein Phloroglucin-Derivat, das Hyperforin. Die chemische Totalsynthese des Hyperforins ist trotz großer Anstrengungen bisher fehlgeschlagen.
- In *H. perforatum* liegen hohe Hyperforin-Konzentrationen in den Knospen, Blüten und Früchten vor. In der verwandten Art, *H. calycinum*, wurden noch keine Hyperforine, jedoch strukturell ähnliche prenylierte Phloroglucinol-Derivate detektiert. Interessanterweise wurde aber in *H. calycinum*-Zellkulturen Adhyperforin und in Spuren Hyperforin gefunden.
- Die Biosynthese des Hyperforins kann in zwei Abschnitte gegliedert werden: erstens die Bildung des Grundgerüsts und nachfolgend die Prenylierungsreaktionen. Die Bildung des Grundgerüsts wird von der Isobutyrophenon-Synthase (BUS), einer Typ III-Polyketid-Synthase (PKS), katalysiert. Dieses Enzym kondensiert das aliphatische Startermolekül Isobutyryl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem intermediären Tetraketid, das im selben aktiven Zentrum zum Phlorisobutyrophenon zyklisiert wird.
- Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die cDNA-Klonierung und funktionelle Expression der BUS. Aus 1 - 3 Tage alten Zellkulturen von *H. calycinum* sowie aus jungen Knospen und Früchten von *H. perforatum* und *H. calycinum* wurde poly(A⁺)-mRNA isoliert und anschließend in cDNA für PCR- und RACE-Techniken überführt. Ferner wurde aus beiden *Hypericum*-Arten genomische DNA isoliert und für die TAIL-PCR verwendet.
- Mit Hilfe degenerierter Primer, die von konservierten Regionen von Typ III-PKS abgeleitet waren, wurden drei cDNA-Fragmente aus *H. calycinum* isoliert, die 77 - 89 % Identität mit CHS und 47 - 59 % Identität mit BPS aufwiesen. Für eines der Fragmente gelang die Isolierung einer Volllänge-cDNA aus *H. calycinum* mit einer Länge von 1397 Basenpaaren. Der offene Leserahmen (ORF) ist 1185 Basenpaare lang und kodiert für ein Protein mit 394 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 43,3 kDa. Ein ähnlicher ORF wurde auch aus *H. perforatum* gewonnen.
- Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht mehr möglich, die kodierten Proteine in *E. coli* heterolog zu exprimieren und funktionell zu analysieren. Sollten die isolierten Volllänge-Klone für BUS kodieren, stünde erstmals eine molekulare Sonde für die Untersuchung der zeitlichen und räumlichen Regulation der Hyperforin-Biosynthese zur Verfügung.

7. Literaturverzeichnis

Abou-Shoer, M.; Boettner, F. E.; Chang, C.-J.; Cassady, J. M.

Antitumor and cytotoxic xanthenes of *Psorospermum febrifugum*.
Phytochemistry 27, 1988, 2795.

Altschul, S.; Madden, T.; Schaffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W., Lipman, D.

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Res 25, 1997, 3389-3402.

Arai, Y.; Watanabe, S.; Kimira, M.; Shimoi, K.; Mochizuki, R.; Kinae, N.

Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration.
J Nutr 130, 2000, 2243-2250.

Austin, M. B.; Noel, J. P.

The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases.
Nat. Prod. Rep. 20, 2003, 79-110.

Austin, M. B.; Noel, J. P.

An Aldol Switch Discovered in Stilbene Synthases Mediates Cyclization Specificity of Type III Polyketide Synthases
Chemistry & Biology, Vol. 11, 1179–1194, September, 2004.

Becker, T.; Golte-Bechtle, M.

Das kleine Was blüht denn da?
Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, 2005, Stuttgart.

Beerhues, L.

Molecules of interest - Hyperforin.
Phytochemistry 67, 2006, 2201-2207.

Belkheir, A. K.

Immunofluorescence Localization of Polyketide Synthases in the Medicinal Plant *Hypericum perforatum*.
Dissertation, 2009, TU Braunschweig

Biber, A.; Fischer, H.; Römer, A.; Chatterjee, S. S.

Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers.
Pharmacopsychiatry 31, (Suppl 1), 1998, 36-43

Birnboim, H. C.; Doly, J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acid Res., 7, 1979, 1513-1523.

Birch, A. J.; Donovan, F. W.

Studies in relation to biosynthesis. I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol Austral.
J. Chem. 6, 1953, 360-368.

Bohne, B.; Dietze, P.

Taschenatlas Heilpflanzen.

Verlag Eugen Ulmer, 2005, Stuttgart.

Boubakir, Z.; Beuerle, T.; Liu, B.; Beerhues, L.

The first prenylation step in hyperforin biosynthesis.

Phytochemistry 66, 2005, 51-57.

Boubakir, Z.

Hyperforin biosynthesis - Characterization and purification of a prenyltransferase from *Hypericum calycinum* cell cultures.

Dissertation, 2006, TU Braunschweig.

Brand, S.

Pflanzliche Polyketidsynthasen des Typ III in *Wachendorfia thyrsiflora* (Haemodoraceae).

Dissertation, 2005, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Butterweck, V.; Wall, A.; Liefländer-Wulf, U.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A.

Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* L. in animal assays for antidepressant activity.

Pharmacopsychiat, 31 (Supplement), 1998, 36-43.

Butterweck, V.; Petereit, F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A.

Solubilized Hypericin and Pseudohypericin from *Hypericum perforatum* L. Exert antidepressant activity in forced swimming test.

Planta Med, 64, 1998, 291-294.

Butterweck, V.; Jürgenliemk, G.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A.

Flavonoids from *Hypericum perforatum* L. show antidepressant activity in forced swimming Test.

Planta Med, 66, 2000, 3-6.

Butterweck, V., Nahrstedt, A.

Was ist bekannt über Johanniskraut? ; Phytochemie und Pharmakologie.

Pharm. Unserer Zeit 3, 2003, 212-219.

Caltagirone, S.; Rossi, C.; Poggi, A.; Ranelletti, FO.; Natali, PG.; Brunetti, M.; Aiello, FB.; Piantelli, M.

Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential.

Int J Cancer 87, 2000, 595-600.

Case-Green, SC.; Southern, EM.

Studies on the base pairing properties of deoxyinosine by solid phase hybridisation to oligonucleotides.

Nucleic Acids Res 22, 1994, 131-136.

Charchoglyan, A.; Abrahamyan, A.; Fujii, I.; Boubakir, Z.; Gulder, T. A. M.; Kutchan, T. M.; Vardapetyan, H.; Bringmann, G.; Ebizuka, Y.; Beerhues, L.

Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissues is suggestive of a metabolic branch point.

Eingereicht. 2007.

Chatterjee, S.; Bhattacharya, S. K.; Wonnemann M.; Singer, A.; Muller, W.E.
Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts.
Life Sci, 63, 1998, 1223-1230.

Chatterjee, S. S.; Biber, A.; Weibezahn, C.
Stimulation of Glutamate, Aspartate and Gamma-Aminobutyric Acid Release from Synaptosomes by Hyperforin.
Pharmacopsychiatry 34 (Suppl. 1), 2001, 11-19.

Chericoni, S.; Testai, L.; Calderone, V.; Flamini, G.; Nieri, P.; Morelli, I.; Martinotti, E.
The xanthenes gentiacaulein and gentiokochianin are responsible for the vasodilator action of the roots of *Gentiana kochiana*.
Planta Med 69, 2003, 770-772.

Cook, NC. ; Samman, S.
Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources.
J Nutr Biochem 7, 1996, 66-76.

Cos, P. ; Ying, L. ; Calomme, M. ; Hu, JP.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, AJ.; Berghe, DV.
Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers.
J Nat Prod 61, 1998, 71-76.

Czygan, F.-C.
Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes.
Zeitschrift für Phytotherapie 14, 1993, 272-278.

Czygan, F.-C.
From a 2500 year old apotrophic comes a current antidepressive. The cultural history and mystique of St. John's wort.
Pharm Unserer Zeit. 2003;32(3):184-190.

Decosterd, L. A.; Stoeckli-Evans, H.; Chapuis, J.-C.; Msonthi, J. D.; Sordat, B.; Hostettmann, K.
New Hyperforin Derivatives from *Hypericum revolutum* VAHL with Growth-Inhibitory Activity against a Human Colon Carcinoma Cell Line.
Helvetica Chimica Acta 72, 1989, 464-471.

Decosterd, L. A.; Hoffmann, E.; Kyburz, R.; Bray, D.; Hostettmann, K.
A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity.
Planta Med. 57 (6), 1991, 548-551.

Ferrer, J.-L.; Jez, J. M.; Bowmann, M. E.; Dixon, R. A.; Noel, J. P.
Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis.
Nature structural biology 6 (8), 1999, 775-784.

Formica, JV.; Regelson, W.
Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids.
Food Chem Toxicol 33, 1995, 1061-1080.

Frohmann, M. A.; Dush, M. K.; Martin, G.

Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer.

Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 1988, 8997-9002.

Gerhard M.

Lehrbuch der biologischen Heilmittel, 1938.

Gastpar, M. T.

Antidepressiva.

Georg Thieme Verlag, 1998, Stuttgart.

Greeson, JM.; Sanford, B.; Monti, DA.

St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature.

Psychopharmacology 153, 2001, 402-414.

Gronquist, M.; Bezzerides, A.; Attygale, A.; Meinwald, J.; Eisner, M.; Eisner, T.

Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (24), 2001, 13745-13750.

Groweiss, A.; Cardellina, JH.; Boyd, MR.

HIV-inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*.

J Nat Prod 63, 2000, 1537-1539.

Gryglewski, RJ.; Korbut, R.; Robak, J.; Swies, J.

On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids.

Biochem Pharmacol 36, 1987, 317-322.

Gudzic, B.; Nedeljkovic, J. M.; Dordevic, S.; Comor, J.J.

Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Hyperici* herb (*Hypericum perforatum* L.) from Vlasina region.

Facta Universitatis, Physics, Chemistry and Technology Vol.1, No.4, 1997, 47-51.

Gurevich, A. L.; Dobrynin, V. N.; Kolosov, M. N.; Popravka, Ryabova, I. D.; Chernov, B. K.; Derbentseva, N. A.; Aizenman, B. E.; Gargulya, A. D.

Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum*.

Antibiotiki (Moscow) 16, 1971, 510-513.

Hadjur, C.; Richard, M.J.; Parat, M.O.; Favier, A.; Jardon, P.

Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cell line MRC5.

J Photochem Photobiol Biol, 27, 1995, 139-146.

Hansen, A.

Bioinformatik.

Birkhäuser Verlag, 2004, Basel-Boston-Berlin.

Hartmann, T.; Ober, D.

Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel: Biologische Notwendigkeit und pharmazeutischer Nutzen.

Carolo-Wilhelmina IBP TU Braunschweig, 1/2003, 26-32.

Hartmann, T.

From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism.

Phytochemistry 68, 2007, 2831-2846.

Hay, A.-E.; Helesbeux, J.-J.; Duval, O.; Labaied, M.; Grellier, P.; Richomme, P.

Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*.

Life Sci 75, 2004, 3077-3085.

Heller, W. & Forkmann, G.

Biosynthesis of flavonoids. The flavonoids: Advances in Research since 1986

Chapmann & Hall, 1994, 499-535.

Hensel W.

Was blüht denn da?

Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, 2006, Stuttgart.

Hertog, MG.; Feskens, EJ.; Hollman, PC.; Katan, MB.; Kromhout, D.

Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study.

Lancet 342, 1993, 1007-1011.

Hölzl, J.; Schütt, H.

Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva?

Pharmaz. Zeitung 46, 1994, 3959-3977.

Iinuma, M.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Asai, F.; Kobayashi, Y.; Stimano, R.; Miyauchi, K.-I.

Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaeous plants against methicillin-resistant

Staphylococcus aureus.

Journal of Pharmacy and Pharmacology 48, 1996, 861-865.

Jansohn, M. (Hrsg.)

Gentechnische Methoden.

Elsevier GmbH, 2007, München.

Kerb, R.; Brockmöller, J.; Staffeldt, B.; Ploch, M.; Roots, I.

Single-dose and steady-state pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin.

Antimicrob Ag Chemother 40, 1996, 2087-2093.

Kim, C.-G.; Yu, T.-W.; Fryhle, CB.; Handa, S.; Floss, HG.

3-Amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC7N units in rifamycin and related antibiotics.

J Biol Chem 273, 1998, 6030-6040.

Kim, HP.; Mani, I.; Iversen, L.; Ziboh, VA.

Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 58, 1998, 17-24.

Klingauf, P.

Hyperforin-Biosynthese, Molekulare Analyse von Polyketid-Synthasen aus *Hypericum perforatum* und *Hypericum calycinum*.
Dissertation, 2004, TU Braunschweig.

Klingauf, P.; Beuerle, T.; Mellenthin, A.; El-Moghazy, S.A.M.; Boubakir, Z.; Beerhues, L.

Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures.
Phytochemistry 66, 2005, 139-145.

Kokubun, T.; Harborne, J. B.

A survey of phytoalexin induction in leaves of the Rosaceae by copper ions.
Z. Naturforsch. 49C, 1994, 628-634.

Kokubun, T.; Harborne, J. B.

Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): Biphenyls or dibenzofurans.
Phytochemistry 40, 1995, 1649-1654.

Kokubun, T.; Harborne, JB.; Eagles, J.; Waterman, PG.

Antifungal biphenyl compounds are the phytoalexins of the sapwood of *Sorbus aucuparia*.
Phytochemistry 40, 1995, 57-59.

Koolman, J.; Röhm, K.-H.

Taschenatlas der Biochemie.
Georg Thieme Verlag, 2003, Stuttgart. New York.

Kück, U. (Hrsg.)

Praktikum der Molekulargenetik.
Springer-Verlag, 2005, Berlin. Heidelberg.

Leistner, E.; Breckle, S.-W.

Pharmazeutische Biologie I
Gustav Fischer Verlag, 1997, Stuttgart. Jena. Lübeck. Ulm.

Leuner, K.; Kazanski, V.; Müller, M.; Essin, K.; Henke, B.; Gollasch, M.; Harteneck, C.; Müller, W. E.

Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels.
FASEB J. 21, 2007, 4101– 4111.

Liang, P.; Pardee, AB.

Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.
Science. 1992 Aug 14;257(5072):967-71.

Linde, K. ; Ramirez, G. ; Mulrow, CD. ; Pauls, A.; Weidenhammer, W.; Melchart, D.

St John's wort for depression an overview and meta-analysis of randomised clinical trials.
BMJ. 1996 Aug 3;313(7052):253-258.

Linsmaier, EM.; Skoog, F.

Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.
Physiol Plantarum 18, 1965, 100-127.

Liu, B.; Falkenstein-Paul, H.; Schmidt, W.; Beerhues, L.

Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases.
The Plant Journal 34, 2003, 847-855.

Liu, B.; Beuerle, T.; Klundt, T.; Beerhues, L.

Biphenyl synthase from yeast-extract- treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*.
Planta 218, 2004, 492-496.

Liu, B.; Raeth, T. ; Beuerle, T.; Beerhues, L.

Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase.
Planta 225, 2007, 1495-1503.

Mandel, M.; Higa, A.

Calcium dependent bacteriophage DNA infection.
J. Mol. Biol., 53, 1970, 159-162.

Maisenbacher, P.; Kovar, K.-A.

Adhyperforin: A Homologue of Hyperforin from *Hypericum perforatum*.
Planta Med. 58, 1992, 291-293.

Mathijssen, R. H. J.; Verweij, J.; de Bruijn, P.; Loos, W. J.; Sparrenboom, A.

Effects of St. John s wort on irinotecan metabolism.
J. Natl. Cancer Inst. 94, 2002, 1247-1249.

Martin, C. R.

Structure, function and regulation of the chalcone synthase.
International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 147, Academic Press Inc, San Diego, 1993, 233-284.

Meyer, V. R.

Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie.
Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004, Weinheim.

Moore, L. B.; Goodwin, B.; Jones, S. A.; Wisely, G. B.; Serabjit-Singh, C.; Willson, T. M.; Collins, J. L.; Kliever, S. A.

St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (13), 2000, 7500-7502.

Morel, C. ; Seraphin, D. ; Teyrouz, A. ; Larcher, G. ; Bouchara, JP. ; Litaudon, M. ; Richomme, P. ; Bruneton, J.

New and antifungal xanthenes from *Calophyllum caledonicum*.
Planta Med 68, 2002, 41-44.

Müller, W. E.; Singer, A.; Wonnemann, M.

Johanniskraut.

Deutsche Apotheker Zeitung 17, 1999, 49-58.

Müller, W. E.; Gastpar, M.

Behandlung von depressiven Patienten in der täglichen Praxis; Stellenwert von Johanniskrautextrakt.

LinguaMed Verlags-GmbH 2001.

Müller, W. E.; Holoubek, G.

Die Pharmakologie von Johanniskrautextrakt; Plausibilität für eine therapeutische Anwendung als Antidepressivum?

Pharm. Unserer Zeit 3, 2003, 220-226.

Müller, W. E.

Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol.*

Res. 47, 2003, 101-109

Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.

Harper's Biochemistry 24 edition.

Appleton & Lange, 1996.

Nakatani K.; Nakahata N.; Arakawa T.; Yasuda H.; Ohizumi Y.

Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells.

Biochem Pharmacol. 2002 Jan 1;63(1):73-9.

Nicholl, D. S. T.

Gentechnische Methoden

Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002, 1995, Heidelberg. Berlin.

Nicolaou, K. C.; Carenzi, G. E. A.; Jeso, V.

Construction of highly functionalized medium-sized rings: Synthesis of hyperforin and perforatumone model systems.

Angew. Chem. Int. Ed. 44, 2005, 101-109.

Nijveldt, R.J.; van Nood, E.; van Hoorn, DE.; Boelens, PG.; van Norren, K.; van Leeuwen, PA.

Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.

Am J Clin Nutr 74, 2001, 418-425.

Nkengfack, AE.; Mkounga, P.; Meyer, M.; Fomum, ZT.; Bodo, B.

Globulixanones C, D and E: three prenylated xanones with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*.

Phytochemistry 61, 2002, 181-187.

Nöldner, M.; Schotz, K.

Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test.

Planta Med. 68 (7), 2002, 577-580.

Öztürk, Y.

Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models.
Pharmacopsychiatry 30 Suppl. 2, 1997, 125-128.

Paniego, N. B., Zuurbier, K. W. M., Fung, S.-Y., van der Heijden, R., Scheffer, J. J. C., Verpoorte, R.

Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones
Eur. J. Biochem. 262, 1999, 612-616.

Pieper, R., Luo, G. L., Cane, D. E. & Khosla, C.

Cellfree synthesis of polyketides by recombinant erythromycin polyketide synthases.
Nature 378, 1995, 263-266.

Philipp

Hypericum extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression: randomised multicentre study of treatment for eight weeks.

BMJ. 1999 Dec 11;319(7224):1534-8. Erratum in: *BMJ* 2000 Feb 5;320(7231):361.

Piscitelli, S. C.; Burstein, A. H.; Chaitt, D.; Alfaro, R. M.; Falloon, J.

Indinavir concentrations and St. John's wort.
Lancet 355, 2000, 547-548.

Quiney, C.; Billard, C.; Salanoubat, C.; Fourneron, J. D.; Kolb, J. P.

Hyperforin, a new lead compound against the progression of cancer and leukemia?
Leukemia 20, 2006, 1519-1525.

Rehm, H.; Hammar, F.

Biochemie light.
Verlag Harri Deutsch, 2001, Frankfurt am Main.

Reichling, J.; Weseler, A.; Saller, R.

A Current Review of the Antimicrobial Activity of *Hypericum perforatum* L.
Pharmacopsychiatry 34 (Suppl. 1), 2001, 116-118.

Reineke, A.

Gentechnik Grundlagen, Methoden und Anwendungen.
Verlag Eugen Ulmer, 2004, Stuttgart.

Richter, G.

Biochemie der Pflanzen.
Georg Thieme Verlag, 1996, Stuttgart. New York.

Richter, G.

Praktische Biochemie.
Georg Thieme Verlag, 2003, Stuttgart.

Schempp, C. M.; Pelz, K.; Wittmer, A.; Schöpf, E.; Simon, J. C.

Antibacterial activity of hyperforin from St. John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria.
The Lancet 353, 1999, 2129.

Schempp, C. M.; Winghofer, B.; Ludtke, R.; Simon-Haarhaus, B.; Schopf, E.; Simon, J. C.

Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells.
Br. J. Dermatol. 142 (5), 2000, 979-984.

Schempp, C.M.; Müller, K. A.; Winghofer, B.; Schöpf, E.; Simon, J. C.

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) Eine Pflanze mit Relevanz für die Dermatologie.
Hautarzt 53, 2002, 316-321.

Schempp CM, Windeck T, Hezel S, Simon JC.

Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream--a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison.
Phytomedicine. 2003;10 Suppl 4:31-7.

Schimmer, O.; Mauthner, H.

Polymethoxylated xanthenes from the herb of *Centaurium erythraea* with strong antimutagenic properties in *Salmonella typhimurium*.
Planta Med 6, 1996, 561-564.

Schrattenholz, A. (Hrsg.)

Methoden der Proteomforschung.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2001, Heidelberg. Berlin.

Schrumpf, G. (Hrsg.)

Gentechnische Methoden.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002, Heidelberg. Berlin.

Schröder, J.

A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions.
Trends in plant Science 2 (10), 1997, 373-378.

Schröder, J.

The chalcone/stilbene synthase-type family of condensing enzymes
Comprehensive Natural Products Chemistry vol. 1, Elsevier, Amsterdam 1999, 749-771.

Schröder, F.

Induzierte chemische Abwehr bei Pflanzen.
Angew. Chemie 110 (9), 1998, 1271-1274.

Schulz, V.

Neue Therapiestudien und Metaanalysen; Johanniskrautextrakte vs. Synthetika.
Pharm. Unserer Zeit 3, 2003, 228-234.

Schulz, V.

Bieten Phytopharmaka ein Einsparpotenzial?; Pharmakoökonomie pflanzlicher Antidepressiva.
Pharm. Unserer Zeit 3, 2003, 248-252.

Shirley, B. W.

Flavonoid biosynthesis: 'New' functions for an 'old' pathway.
Trends in Plant Science 1, 1996, 377-382.

Sielmann, E. H.; Creasy, L. L.

Concentration of phytoalexin resveratrol in wine.
Am J. Enol. Vitic. 43, 1992, 49-52.

Sckell, O.

Repetitorium der Allgemeinen Botanik für Mediziner, Pharmazeuten und Biologen von
Dr. O. Sckell
Dr. O. Sckell Verlag.

Sparrenberg, B.

MAO-inhibierende Eigenschaften von Hypericum Inhaltsstoffen und Untersuchungen zur
Analytik und Isolierung von Xanthonen aus *Hypericum perforatum* L.
Dissertation, Marburg, 1993.

**Suzuki, O. ; Katsumata, Y. ; Oya, M. ; Chari, VM. ; Vermes, B. ; Wagner, H. ;
Hostettmann, K.**

Inhibition of type A and type B monoamine oxidases by naturally occurring xanthonen.
Planta Med 42, 1981, 17-21.

Suzuki, O.; Katsumata, Y.; Oya, M.; Blatt, S.; Wagner, H.

Inhibition of monoamine oxidase by hypericin.
Planta Med 50, 1984, 272-274.

Tekelova, D.; Repcak, M.; Zemkova, E.; Toth, J.

Quantitative Changes of Dianthrone, Hyperforin and Flavonoids Content in the Flower
Ontogenesis of *Hypericum perforatum*.
Planta Med. 66, 2000, 778-780.

Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schröder, J. & Schröder, G.

Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the
course of evolution.
Journal of Molecular Evolution 38, 1994, 610-618.

Vorbach, EU.; Arnoldt, KH.; Hubner, WD.

Efficacy and tolerability of St. John's wort extract LI 160 versus imipramine in patients with
severe depressive episodes according to ICD-10.
Pharmacopsychiatry. 1997 Sep;30 Suppl 2:81-5.

**Vandenbogaerde, A. L.; Delaey, E. M.; Vantiegem, A. M.; Himpens, B. E.; Merlevede,
W. J.; De Witte, P. A.**

Cytotoxicity and antiproliferative effects of hypericin and derivatives after photosensitization.
Photochem Photobiol. 67, 1998, 119-125.

Wang, HK.; Xia, Y.; Yang, ZY.; Natschke, SL.; Lee, KH.

Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as
antitumor and anti-HIV agents.
Adv Exp Med Biol 439, 1998, 191-225.

Weil, J.-H.

Biochimie générale

Masson, 7e édition 1994.

Wellhöner, H.-H.

Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie.

Springer-Verlag, 1975, 1976, 1982, 1988, 1990, Berlin. Heidelberg.

Wheatley D.

LI 160, an extract of St. John's wort, versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients--a controlled 6-week clinical trial.

Pharmacopsychiatry. 1997 Sep;30 Suppl 2:77-80.

Yamazaki, Y., Suh, D.-Y., Sitthithaworn, W., Ishiguro, K., Kobayashi, Y., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Sankawa, U.Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant, *Psilotum nudum*.

Planta 214, 2001, 75-84.

Zapletalová, P.

Untersuchungen zum Vorkommen von Hyperforin und Adhyperforin in Zellkulturen verschiedener Hypericum-Arten.

Diplomarbeit, 1999, Bonn.

Zhang, S.; Yang, X.; Morris, M. E.

Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2) mediated transport.

Pharm. Res. 21, 2004, 1263-1273.

Zuurbier, K. W. M.; Fung, S.-Y.; Scheffer, J. J. C.; Verpoorte, R.In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*.

Phytochemistry 49 (8), 1998, 2315-2322.

Zuurbier, K. W. M.; Leser, J.; Berger, T.; Hofte, A. J. P.; Schröder, G.; Verpoorte, R.; Schröder, J.

4-Hydroxy-2-pyrone formation by chalcone and stilbene synthase with nonphysiological substrates.

Phytochemistry 49 (7), 1998, 1945-1951.

8. Anhang

Basen - und Aminosäuresequenzen der mutmaßlichen BUS

Basensequenz des ORF 1 aus *H. calycinum*

5'-ATGGTWACWGTTGAGGAGGTYAGGAATGCCCAGAGGGCAGATGGCCCCGC
CACCGTGCTTGCCATCGGCACGGCCACCCCGGCTCACTGCgTCCTCCAATCCGAGT
ACCCCGACTATTACTTCCGCATTACCAACAGCGAGCACATGACCGACCTCAAAGA
AAAGTTCAAGCGCATGTGTGACAAGTCGTACATTAAGAAGCGGTACATGCACCTG
ACGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCCTAAGATGTGCGACTACTGGTCGCCGACC
CTCGACGCCCCGGCAGGACATCGTCGTGGTGGAGATCCCCAAGCTCGGGAAGGAG
GCGGCCGTGAAGGCGATCAAGGAGTGGGGGCAGCCCAAGTCCAAGATCACTCAC
CTCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCCGGCGCCGACTACCAGCTCA
CCAAGCTCCTCGGCCTCCGSCCSAYKATRATCGMATTATGATGTAtCAGCAAGGG
TGTTTCGCCGGCGGGCACCGTCCTCCGCCTTGCCAAGGATCTCGCTGAGAACAACC
GCGGTGCCCCGCGTCCTCGTAGTTTGCTCCGAGATCACGGCTGTCACCTTCCGAGG
CCCCTCCGAGACCCACCTCGACTCCATGGTCGGTCAGGCCCTCTTTGGGGACGGA
GCTGCCGCGATCATCGTGGGGGCCGACCCGGACCCGGTCCTCGAGAAACCCCTCT
TCCAGCTCGTCTCCGCATCGCAGACCATCCTCCCGGACTCGGAAGGGGGCCATTGA
CGGCCACCTGAGGGAGGTGGGCCTCACCTTCCACCTGCTAAAGGACGTGCCAGG
GCTCATCTCTAAAAACATAGAGAAGAGTTTGGTGGAGGCGTTCAAGCCCATAGG
GATCAGCGACTGGAACCTCCTTCTGGATCGCCCACCCCGGCGGAATCGCCATC
CTGGACCAGGTTGAAGCCAAGCTCGCCCTCAAGGAGGAGAAGCTGAGGTCCACC
CGACAAGTGCTCAGCGGTTACGGGAACATGTTCGAGCGCCTGCGTGCTGTTTATAC
TTGATGAGATGAGGAACAAGTCCGTCGAGGAAGGGAAGGCCACCACCGGAGAGG
GGCTCGAGTGGGGCGTCCTCTTAGGGTTCGGACCCGGCCTCACCGTCGAGACCGT
CGTCTCCACAGTCTTCCCACCCACCAGGCCGCCGCCTAG-3'

Aminosäuresequenz des ORF 1 aus *H. calycinum*

MVTVEEVRNAQRADGPATVLAIGTATPAHCVLQSEYPDYYFRITNSEHMTDLKEKFK
RMCDKSYIKKRYMHLTEEILKENPKMCDYWSPTLDARQDIVVVEIPKLGKEAAVKAI
KEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPHXXRIMMYQQGCFAGGTV
LRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSMVGQALFGDGAAAIIVGAD
PDPVLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKNIEKSLVEAF
KPIGISDWNLSLFWIAHPGGIAILDQVEAKLALKEEKLSTRQVLSGYGNMSSACVLFIL
DEMRNKSVEEGKATTGEGLEWGVLLGFPGPLTVETVVLHSLPTHQAAA.

Abb. 8.1: Basen - und Aminosäuresequenz des ORF 1 aus *H. calycinum*

Basensequenz des Fragments 2 aus *H. calycinum*

5'-GGGTGTGTGGCGGGGGGCACGGTCCTTAGGTTAGCCAAGGACTTAGCCGAGA
ACAACAAAGGTGCTCGTGTCCCTAGTTGTGTGCTCAGAGATCACTGCTATTACTTTT
CGAGGCCCAAGTGAAACCCATATGGACAATCTTGTGGGTCAAGCCATATTTGGAG
ATGGAGCAAGTGCAATCATAATTGGTTCAGATCCTGTCCCTGAGGTGGAGAGGCC
TTTATTTGAGCTGCTTTCTGCCACCCAGACAATTCTTCCCGATAGTCACGGTGCGA
TTGAAGGACACCTCTGTGAAGTTGGACTAACATTCCATCTTCGTAAGGATGTTCC
GGAGCTTATCTCGAAGAATATTGACAAGAGTTTGAAGGAGGCATTCGAGCCGCTA
GGAATTTCTGATTGGAATTCAATTTTCTGGATAGCCCACCCCGGCGGCTCCGGCA
TAATNCTAAACAAAATTGAGCAGAAATTAAGCCTGGAGCCCCAAAAAACTCCGAG
CTACAAGACATGTGTTGAGCGAATATGGGAACATGTCGAGTGC GTCTGTCTTATT
CATACTTGATGAGATGAGGAAAGCGACGAGTAAAGATGGACATAGCACCACAGG
AGAAGGGCTAGAATGGGGTGTGCTCTTCGGTTTTGGACCTGGTCTGACGGTCGAG
ACGGTGGCTCTACGCAGTYTCAATATTA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Aminosäuresequenz des Fragments 2 aus *H. calycinum*

GCVAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITAITFRGPSETHMDNLVGQAIFGDGA
SAIIIGSDPVPEVERPLFELLSATQTILPDSHGAIEGHLCEVGLTFHLRKDVPELISK
KSLKEAFEPLGISDWNSIFWIAHPGGSGIXLNKIEQKLSLEPKKL RATHVLSEYGNMS
SASVLFILDEM RKATSKDGHSTTGEGLEWGVLF GFGPGLTVETVALRS.

Abb. 8.2: Basen - und Aminosäuresequenz des Fragments 2 aus *H. calycinum*

Basensequenz des Fragments 4 aus *H. calycinum*

5'-ATTATGATGTAYCAGCARGGGTGCTATGCAGGTGGAAGTGTCTTCGAGCCGC
TAAGGATCTTGCAGAGAATAATGTAGGAGCACGAGTTCTTGTAGTGTGCTCTGAG
ATCACTGTTGTTACATTCCGTGGGCCTTCCGAMACTGCTTTGGACTCCCTAGTTGG
CCAAGCCCTTTTTGGTGATGGGTCTGCAGCTGTGATCGTTGGATCAGATCCAGAC
GTTTCGATTGAACGACCACTCTTCCAGCTCGTTTCAKCAGCGCAAACATTTATTCC
TAATTCAKCAGGTGCTATTGCGGGCAACTTACGTGAAGTGGGTCTCACCTTTCATT
TGTGGCCTAATGTGCCTACTTTGATCTCTGAAAACATAGAGAAATGTTTGACTCA
AGCTTTTGACCCAATTGGTATTAGTGACTGGAATTCCTTATTTTGGATTGCTCATC
CAGGTGGCCCAGCTATTCTTGACGCGGTTGAAGCAAACTCAATTTAGAGAAAAA
GAAACTCGAAGCAACAAGGCATGTGTTAAGTGAGTACGGTAACATGTCTAGTGC
ATGTGTGTTGTTTATTTTGGATGAGATGAGAAAGAAATCTCTGAAGGGGGAAAAG
GCCACCACGGGTGAAGGATTGGATTGGGGCGTCYTCTTYGGC-3'

Aminosäuresequenz des Fragments 4 aus *H. calycinum*

IMMYQQGCYAGGTVLRAAKDLAENNVGARVLVVCSEITVVTFRGPSXTALDSLVG
ALFGDGSAAVIVGSDPDVSIERPLFQLV SXAQTFIPNSXGAIAGNLREVGLTFHLWPN
VPTLISENIEKCLTQAFDPIGISDWN SLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRH
VLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSLKGEKATTGEGLDWGVXFG

Abb. 8.3: Basen - und Aminosäuresequenz des Fragments 4 aus *H. calycinum*

Basensequenz des Fragments 1-1 aus *H. perforatum*

5'-CCGAGTACCCCGACTATTACTTCCGCATTACCAACAGCGAGCACATGACCGAC
CTCAAAGAAAAGTTCAAGCGCATGTGCGACAAGTCGTACATTAAGAAGCGGTAC
ATGCACCTGACGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCATAAGATGTGCGACTACTG
GTCGCCGACCCTCGACGCCCCGGCAGGACATCGTCGTGGTGGAGATCCCCAAGCTC
GGGAAGGAGGCGGCCGTGAAGGCGATCAAGGAGTGGGGSCAGCCCAAGTCCAAG
ATCACTCACCTCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCCGGCGCCGAC-3'

Aminosäuresequenz des Fragments 1-1 aus *H. perforatum*

EYPDYYFRITNSEHMTDLKEKFKRMCDKSYIKKRYMHLTEEILKENHKMCDYWSPT
LDARQDIVVVEIPKLGKEAAVKAIKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGAD

Abb. 8.4: Basen - und Aminosäuresequenz des Fragments 1-1 aus *H. perforatum*

Basensequenz des Fragments 1-2 aus *H. perforatum*

5'-ATTATGATGTATCAGCAAGGGTGTTTCGCTGGCGGCACCGTCCTCCTCCTTGCC
AAGGATCTCGCTGAGAACAAACGCGGTGCCCCGCGTCCTCGTCGTTTGCTCCGAGA
TCACGGCTGTCACCTTCCGAGGCCCTCCGAGACCCACCTCGACTCCATGGT-3'

Aminosäuresequenz des Fragments 1-2 aus *H. perforatum*

IMMYQQGCFAGGTVLLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSM

Abb. 8.5: Basen - und Aminosäuresequenz des Fragments 1-2 aus *H. perforatum*

9. Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name: **William Meva Meva**
Geburtsdatum: 06. August 1974
Geburtsort: Akonolinga / Kamerun
Nationalität: Kameruner
Religion: evangelisch
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

- Grundschule in Paris (Ficatier Courbevoie) / Frankreich
 - Grundschule in Yaoundé (École du centre, École de Bastos) / Kamerun
 - Gymnasium in Yaoundé (Lycée Général Leclerc) / Kamerun
- 06/1994 Abitur im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Zweig

Studium:

- Studium der Biochemie an der Universität Yaoundé I / Kamerun
- 02/2000 „Diplôme de licence en Biochimie“
Vertiefungsfächer: Chemie und Biologie der Pflanzen
- 09/2002 „Diplôme de Maîtrise en Biochimie“
Vertiefungsfächer: Phytobiochemie und Phytopathologie

Deutsche Sprachausbildung:

- 03/2003 - 07/2003 Sprachkurs am Goethe-Institut Yaoundé / Kamerun
 - 10/2003 - 03/2004 Intensivkurs am Sprachzentrum der TU Braunschweig
- 03/2004 DSH (Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang)
- 04/2004 - 07/2004 Propädeutikum an der TU Braunschweig
(Sprachkurs zur Vorbereitung auf das Studium an der TU Braunschweig)

Weitere Sprachkenntnisse:

- Französisch (Muttersprache)
- Englisch

Promotion:

Seit 10/2004 Doktorand, Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Betreuer im Biochemie-Praktikum am Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig (AG Beerhues)

Engagement:

- Sekretär des Vereins der Biochemie-Studenten im Master-Jahr (2001-2002)
Universität Yaoundé I / Kamerun
- Mitorganisator des CICIBA-Kolloquiums 03/2003 Yaoundé/Kamerun
(CICIBA, Centre International de revalorisation de la Civilisation Bantou: Internationales Zentrum zur Wertschätzung der Bantu-Zivilisation)

Interessen:

Musik, Lesen, Sport

